



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

FREDERICO FERNANDES RIBEIRO MAIA

**VALOR DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE APOPTOSE, ANGIOGÊNESE E
PROLIFERAÇÃO CELULAR NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LESÕES
BENIGNAS E MALIGNAS DA TIREOIDE: CORRELAÇÃO CLÍNICA, CITOLÓGICA
E ULTRASSONOGRÁFICA**

*Value of apoptotic, angiogenesis and proliferation cell protein expression in diagnosis
of malign and benign thyroid lesions: clinical, sonographic and cytological correlation*

CAMPINAS

2015

FREDERICO FERNANDES RIBEIRO MAIA

**VALOR DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE APOPTOSE, ANGIOGÊNESE E
PROLIFERAÇÃO CELULAR NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LESÕES
BENIGNAS E MALIGNAS DA TIREOIDE: CORRELAÇÃO CLÍNICA, CITOLÓGICA
E ULTRASSONOGRÁFICA**

*Value of apoptotic, angiogenesis and proliferation cell protein expression in diagnosis
of malign and benign thyroid lesions: clinical, sonographic and cytological correlation*


Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de
concentração em Clínica Médica.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. José Vassallo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO

ALUNO **FREDERICO FERNANDES RIBEIRO MAIA**, E ORIENTADO
PELA PROF. DRA. DENISE ENGELBRECHT ZANTUT WITTMANN.



CAMPINAS

2015

CAPES: aluno bolsista (nº 33003017065P0 - CLÍNICA MÉDICA)

FAPESP (processo 2008/10183-7): auxílio de pesquisa.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M28v Maia, Frederico Fernandes Ribeiro, 1979-
Valor da expressão de marcadores de apoptose, angiogênese e proliferação celular no diagnóstico diferencial de lesões benignas e malignas da tireoide : correlação clínica, citológica e ultrassonográfica / Frederico Fernandes Ribeiro Maia. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Denise Engelbrecht Zantut Wittmann.
Coorientador: José Vassalo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Nódulo da glândula tireoide. 2. Citologia. 3. Neoplasias da glândula tireoide. 4. Apoptose. I. Zantut-Wittmann, Denise Engelbrecht, 1959-. II. Vassalo, José. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Value of apoptotic, angiogenesis and proliferation cell protein expression in diagnosis of malign and benign thyroid lesions : clinical, sonographic and cytological correlation

Palavras-chave em inglês:

Thyroid nodule

Cytology

Thyroid neoplasms

Apoptosis

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Denise Engelbrecht Zantut Wittmann [Orientador]

Glaucia Maria Ferreira da Silva Mazeto

Rosalinda Yossie Asato de Camargo

Marcos Antonio Tambascia

Ligia Vera Montali da Assumpção

Data de defesa: 07-08-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

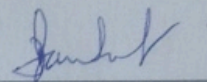
FREDERICO FERNANDES RIBEIRO MAIA

ORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). DENISE ENGELBRECHT ZANTUT WITTMANN

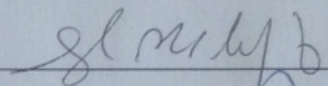
COORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). JOSÉ VASSALO

MEMBROS:

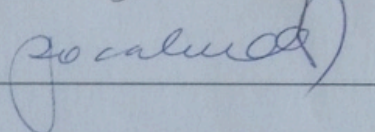
1. PROF(A). DR(A). DENISE ENGELBRECHT ZANTUT WITTMANN



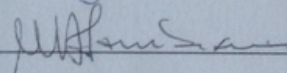
2. PROF(A). DR(A). GLAUCIA MARIA FERREIRA DA SILVA MAZETO



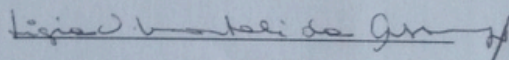
3. PROF(A). DR(A). ROSALINDA YOSSIE ASATO DE CAMARGO



4. PROF(A). DR(A). MARCOS ANTONIO TAMBASCIA



5. PROF(A). DR(A). LIGIA VERA MONTALI DA ASSUMPÇÃO



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07 de agosto de 2015

DEDICATÓRIA

A minha esposa Fernanda, pelo apoio contínuo e compreensão nos momentos difíceis durante essa longa jornada...pois “juntos somos imbatíveis”...

***“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação,
não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita ou não faz.”***

Ayrton Senna

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Denise Engelbrecht Zantut-Wittmann, minha orientadora, pelo apoio e dedicação contínuos, paciência e amizade construída e aprimorada nesses anos de convivência, e, sobretudo, respeito e carinho com que sempre se dirigiu a mim.

Ao Prof. Dr. José Vassallo, co-orientador, pela competência científica transmitida nesse período, opiniões valiosas na interpretação dos dados e elaboração dos trabalhos, minha gratidão e admiração.

À Prof. Dra. Patrícia Sabino Matos, do Departamento de Patologia da FCM-Unicamp, pela disponibilidade e colaboração contínua durante as várias horas de pesquisa em seu laboratório; e, sobretudo, pelo respeito e atenção sempre a mim dispendido.

Aos funcionários do SAM-HC (serviço de arquivo médico), por toda paciência e auxílio no agendamento dos inúmeros prontuários analisados; foram fundamentais para o aumento de nossa casuística e obtermos resultados satisfatórios.

A toda equipe da disciplina da Endocrinologia, Prof.s Marcos A. Tambascia, Elizabeth J. Pavin, Heraldo Mendes, Maria Cândida Parisi, Walter Minicucci, e Ligia V. M. Assumpção, com os quais tive o prazer de trabalhar lado a lado nesse período, meu muito obrigado pelo respeito e atenção sempre a mim dispendido, durante todo período de estágio docente no ambulatório de nódulo tireoidiano, nas 4as feiras, no HC-UNICAMP.

Aos alunos da graduação e médicos residentes do Serviço de Endocrinologia do HC-Unicamp, pela colaboração, convivência e aprendizado no dia a dia.

Aos amigos do LAPE-CAISM, Glauce A. Pinto, Marisa A. Matsura e secretária Rose, por toda paciência e atenção na elaboração das reações por imunoistoquímica e liberdade e conforto com que pude transitar no laboratório nesse período.

À minha esposa, Fernanda Maia, simplesmente por acreditar que posso ser melhor como pessoa e profissional, sua parceria foi fundamental; pelas noites de sono mal dormidas ...meu sincero muito obrigado meu amor!

A meu irmão Felipe Maia, um obrigado especial, pela amizade e companheirismo; por acreditar nos meus projetos sempre que chamado; pelo exemplo acadêmico, já mestre e doutor, pude compartilhar momentos importantes durante essa trajetória a seu lado.

Aos meus pais por todo apoio, exemplo e ensinamentos ao longo dos anos; e todos aqueles familiares, amigos e colegas de trabalho, que de uma forma ou de outra se fizeram presentes nessa longa trajetória.

A CAPES, como aluno bolsista (nº 33003017065P0 - CLÍNICA MÉDICA) e à FAPESP (processo 2008/10183-7), pelo auxílio de pesquisa.

RESUMO

Nódulos tireoidianos são frequentes em nosso meio, sendo que em 10 a 30% dos casos a citologia é indeterminada. A avaliação combinada por métodos de imagem e citologia pelos atuais critérios ultrassonográficos TI-RADS (*thyroid imaging reporting and data system*) e citológico (Bethesda) em nódulos indeterminados ainda é pouco explorada na literatura. O uso de marcadores moleculares na citologia vem sendo investigado e pode representar ferramenta auxiliar no manejo do nódulo indeterminado. Estudos prévios evidenciam a participação de diversas proteínas relacionadas à apoptose, proliferação celular e angiogênese em diferentes tipos de neoplasias. No entanto, o papel desses marcadores na tumorigênese tireoidiana ainda não está bem estabelecido na literatura. Esse estudo analisou o perfil de expressão de proteínas de apoptose, angiogênese e controle do ciclo celular em diferentes lesões tireoidianas, e seu impacto clínico na diferenciação histológica de nódulos benignos e malignos de tireoide. Buscamos ainda estratificar o risco de malignidade em nódulos com citologia indeterminada pela combinação de método que avalia imagem ultrassonográfica (TI-RADS) e a classificação citológica pelo sistema de Bethesda. Revisamos os dados clínicos, cito-, histopatológicos e de imagem à ultrassonografia (US) de 242 pacientes, sendo 138 casos incluídos no estudo por imunistoquímica (IHC). As citologias e laudos/imagens de US foram revisados às cegas e classificados pelos sistemas Bethesda e TI-RADS, respectivamente. Avaliamos a expressão de marcadores de angiogênese (VEGF), crescimento celular (p27, Ki-67) e apoptose (Fas, FasL, Bcl-2, Mcl-1) por IHC em 282 tecidos tireoidianos parafinados: 81 neoplasias (22 adenomas foliculares, AF; 59 carcinomas papilíferos, CPT) e 201 lesões não tumorais (57 casos de bócio colóide; 33, de tireoidite de Hashimoto, e 111 de tecidos tireoidianos normais). Variáveis clínicas e pela US foram comparadas aos resultados de expressão dos diversos marcadores utilizados. Pela citologia de Bethesda, identificamos malignidade em 8,7%, 51,3% e 67,5% dos casos de categorias III, IV e V, respectivamente. Verificamos que 80% dos nódulos com citologia Bethesda III apresentavam TI-RADS 3 e 4A (baixa suspeita de malignidade), com valor preditivo negativo (VPN) de 90%. Os nódulos de alta suspeita à US (TI-RADS 4B e 5) com citologias IV e V de Bethesda apresentaram alto risco de malignidade (75% e 76,9%, respectivamente;

$P<0,001$). A expressão da proteína Mcl-1 foi mais evidente em nódulos malignos (CPT, 91,2%) versus benignos (30,4%, $P=0,003$), com alto VPN: 91%; valor preditivo positivo, VPP: 68,4% e acurácia de 78%. Alta frequência de expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 foi observada em tumores malignos (CPT, 34%) vs. benignos (AF, 19%; $P=0,031$). Nos casos de CPT que apresentavam forte expressão de Mcl-1 ($n=38$, 66,7%), foi observada maior taxa de expressão de Ki-67 simultaneamente, em 57,5% dos casos, que resultou em maior especificidade (71%) e VPP (75,8%). Os demais marcadores (VEGF, p27, Fas, FasL, e Bcl-2) não mostraram diferença estatística na caracterização de nódulos benignos e malignos. Não houve correlação entre a expressão de Mcl-1 e as variáveis clínico-ultrassonográficas. A combinação dos sistemas classificatórios TI-RADS (US) e citológico de Bethesda aumentou a acurácia na determinação do risco de malignidade em nódulos com citologia indeterminada. Verificamos uma frequência significativa de forte expressão de Mcl-1 em casos de CPT, com alta acurácia na diferenciação histológica entre lesões benignas e malignas. O perfil de forte expressão Mcl-1(+)/Ki-67(+) proporcionou maior especificidade e VPP na diferenciação histológica de malignidade; podendo servir de base para futuros estudos em relação ao prognóstico do câncer de tireoide, bem como na área diagnóstica, que envolva o estudo de marcadores moleculares na citologia de nódulos tireoidianos.

Palavras-chave: Nódulo de tireoide. TI-RADS. Citologia de Bethesda. Câncer de tireoide. Mcl-1. Ki-67. Carcinoma papilífero de tireoide. Apoptose.

ABSTRACT

Thyroid nodules are a clinical common problem and cytology is indeterminate in 10-30% of cases. The combination of ultrasound (US) criteria as thyroid imaging reporting and data system (TI-RADS) and Bethesda cytological classification system in indeterminate thyroid nodules has not been examined extensively. The molecular analysis of thyroid cytology samples may help clinicians and should facilitate the optimal management. Although there are evidences of the involvement of apoptotic, angiogenic and proliferative proteins in other solid tumors, data on thyroid carcinomas are still lacking. This study evaluates the relationship between expression of apoptotic, angiogenic and proliferative cell markers and thyroid nodule, and their clinical utility in differential diagnosis of benign and malign thyroid lesions. We still aimed to stratify indeterminate nodules (Bethesda III to V) according to risk of malignancy determined by combining US (TI-RADS) and cytology (Bethesda) classification system. Histopathological, cytological and US data from 242 patients were reviewed, including 138 nodules available for immunochemistry (IHC) study. All thyroid cytopathological slides and US reports were blinded reviewed and classified according to Bethesda system and TI-RADS scores. We used both visual and semi-quantitative IHC analysis to evaluate expression of angiogenic (VEGF), growth cell (Ki-67, p27), and apoptotic markers (Fas, FasL, Bcl-2, Mcl-1) in 282 paraffin-embedded thyroid tissues as follows: 81 neoplastic (22 follicular adenomas, TFA; 59 papillary carcinomas, PTC) and 201 non-neoplastic tissues (57 adenomatoid nodules, AN; 33 Hashimoto's thyroiditis, HT; and 111 normal thyroid tissue). Clinical history and US data were compared to all markers expression. The malignancy rate was 8.7%, 51.3% and 67.5% for cytological results obtained previously the surgery and classified as Bethesda categories III, IV and V, respectively. TI-RADS 3 and 4A scores (low suspicious) were observed in 80% of Bethesda III, led to 90% NPV. For nodules scored as TI-RADS 4B and 5 (high suspicious), the combined Bethesda IV and V resulted higher malignancy risk (75% and 76.9%, respectively, $P<0.001$). The Mcl-1 expression was evident in 30.4% of benign versus 91.2% of malign tissues ($P=0.003$; negative predictive value, NPV = 91%; positive predictive value, PPV = 68.4%; 78% accuracy). The proliferative cell marker Ki-67 stained positive in 34% of PTCs versus 19% of TFAs ($P=0.031$). Mcl-1 and Ki-67 strong co-expression were

identified in 57.5% PTCs, enhancing specificity (71%) and PPV (75.8%). VEGF, p27, Fas, FasL, and Bcl-2 immunostaining showed no difference between malign and benign neoplasms. Mcl-1 expression was not associated with any clinical or image feature of malignancy. In summary, a surgical approach should be considered for thyroid nodules classified as indeterminate cytology when TI-RADS 4B and 5 were concomitant. Moreover, this study demonstrates the frequent occurrence of Mcl-1 expression in PTC specimens. Mcl-1 expression by IHC in thyroid tissues was hard to distinguish PTCs from benign thyroid diseases. The Mcl-1(+)/Ki-67(+) strong expression profile enhancing specificity and PPV for histologically diagnosis, which may serve as the basis for future research in the thyroid cancer prognosis and diagnostic field of molecular markers obtained during a cytological analyzes.

Key words: Thyroid Nodule. TI-RADS. Cytological Bethesda System. Thyroid Cancer. Mcl-1. Ki-67. Papillary thyroid cancer. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Ilustração esquemática da estrutura da proteína Mcl-1.....	34
Figura 2.	Ilustração esquemática da estrutura e regulação da estabilidade da proteína Mcl-1.....	36
Figura 3.	Esquema da ação potencial do complexo PTEN/PI3K/Akt sobre a via GSK3 – Fbw7 mediando a atividade Mcl-1.....	37
Figura 4.	Cronograma e etapas do estudo no período de 2011 a 2015	47
Figura 5.	Desenho do estudo: lesões neoplásicas e não tumorais submetidas à análise por imuno-histoquímica, FCM-UNICAMP, 2015. AF, adenoma folicular. CPT: carcinoma papilífero de tireoide. CMT: carcinoma medular de tireoide. TMA: banco de micro-tecidos.....	48
Figura 6A.	Fluxograma adaptado de Russ e cols. (17) para caracterização dos nódulos tireoidianos pela ultrassonografia e classificação pelo sistema TI-RADS: parâmetros benignos.....	51
Figura 6B.	Fluxograma adaptado (17) para caracterização dos nódulos tireoidianos pela ultrassonografia e classificação pelo sistema TI-RADS: parâmetros suspeitos para malignidade.....	52
Figura 7.	Etapas para construção das micromatrizes teciduais (TMA): revisão de lâmina e bloco de parafina para diagnóstico histológico no departamento de patologia da UNICAMP, com marcação das área tumoral e peri-tumoral; configurando o bloco doador; seguiu-se o envio desse material ao hospital AC Camargo para elaboração do TMA (“bloco receptor”), com posterior marcação pelos anticorpos específicos no Laboratório de Patologia Especial (LAPE) da UNICAMP (LAPE-CAISM)	54
Figura 8.	Representação esquemática da forte expressão de Mcl-1 em nódulos de tireoide operados. CPT: carcinoma papilífero de tireoide; VPP: valor preditivo positivo; e VPN, valor preditivo negativo.....	64

- Figura 9.** Expressão e distribuição das proteínas Ki-67 e Mcl-1 em lesões malignas e benignas de tireoide: Forte expressão dos marcadores Ki-67 (a) e Mcl-1 (c) em tecido maligno (carcinoma papilífero) de tireoide; Baixa ou ausente expressão de Ki-67 (b) e Mcl-1 (d) em bócio e tireoide normal (x200), respectivamente..... 65
- Figura 10.** Representação esquemática da expressão dos marcadores Mcl-1 e em associação com Ki-67 em nódulos de tireoide operados. PTC: carcinoma papilífero de tireoide; VPP: valor preditivo positivo; e VPN, valor preditivo negativo..... 67
- Figura 11.** Forte expressão citoplasmática de VEGF-A em lesão benigna (bócio) em relação a fraca/ausente expressão de VEGF em tecido tireoidiano normal (NOR) (x200)..... 68
- Figura 12.** Expressão imuno-histoquímica da proteína anti-apoptótica Mcl-1 em nódulos de tireoide com citologia inicial indeterminada..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Anticorpos marcadores de apoptose, angiogênese e controle do ciclo celular, empregados no estudo imuno-histoquímico de lesões tireoidianas benignas e malignas.....	55
Tabela 2.	Resultados da citologia conforme a classificação de Bethesda e correlação histológica final em 242 nódulos tireoidianos operados no HC-UNICAMP, de 2000 a 2012.....	58
Tabela 3.	Parâmetros clínico-laboratoriais de 242 pacientes portadores de nódulos de tireoide classificados de acordo com a histologia.....	59
Tabela 4.	Risco de malignidade pelo escore TI-RADS (<i>thyroid imaging reporting and data system</i>) em nódulos tireoidianos operados conforme histologia (benignos vs. malignos) no HC-UNICAMP, 2000-2012.....	60
Tabela 5.	Risco de malignidade em 127 nódulos indeterminados e suspeitos de tireoide pela avaliação combinada TI-RADS e Bethesda, operados no HC-UNICAMP.....	61
Tabela 6.	Frequência comparativa de alta expressão dos marcadores de apoptose, angiogênese e controle do ciclo celular em 282 lesões benignas e malignas de tireoide.....	63
Tabela 7.	Correlação da expressão da proteína Mcl-1 com parâmetros clínico-patológicos em diferentes lesões tireoidianas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACE:	<i>American Association of Clinical Endocrinologists</i>
Ac-TPO:	Anticorpos anti-tireoperoxidase
Ac-Tg:	Anticorpos anti-tireoglobulina
AJCC:	União Internacional contra o câncer
AOR:	<i>Odds ratio adjustment</i> (razão de chances ajustada)
ATA:	<i>American Thyroid Association</i>
AN:	Bócio adenomatoide
AF:	Adenoma follicular
CFT:	Carcinoma folicular da tireoide
CPT:	Carcinoma papilífero de tireoide
CPT-VF:	Carcinoma papilífero de tireoide variante folicular;
CMT:	Carcinoma medular da tireoide
BMN:	Bócio multinodular
Bcl-2:	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BRAF:	RAF quinase tipo Beta
CEP:	Comitê de ética em Pesquisa em seres humanos
CK19:	Citoqueratina 19
DAT:	Doença tireoidiana autoimune
EIA:	Electroquimioluminescência
EIS:	Impedância elétrica de varredura
FN:	Falso-negativo
Gal-3:	Galectina 3
HC-Unicamp:	Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas

HBME-1:	<i>Hector Battifora Mesothelial-1</i>
IHQ:	Imuno-histoquímica
MAPK:	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
Mcl-1:	<i>Myeloid cell leukemia-1</i>
MUC-1:	Mucin-1
NU:	Bócio uninodular
NOR:	Tecido tireoidiano normal
PAAF:	Punção aspirativa por agulha fina
PAAF-US:	Punção aspirativa por agulha fina guiada por US
p53:	<i>Tumor protein p53</i>
PAX8:	<i>Paired box 8</i>
PTEN:	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RET:	<i>Rearranged during transfection</i>
ROC:	<i>Receiver operating characteristic</i>
TH:	Tireoidite de Hashimoto
T4L:	Tiroxina livre
T3L:	Triiodotironina livre
TSH:	Hormônio estimulador da tireoide
TI-RADS:	<i>Thyroid imaging reporting and data system</i>
TMA:	<i>Tissue microarray</i> (micromatriz tecidual)
TNM:	Estadiamento Tumor Linfonodo Metástase
TRAIL:	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
US:	Ultrassonografia
VEGF:	Fator vascular de crescimento endotelial

VEGFR: Receptor do Fator vascular de crescimento endotelial

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS	24
REVISÃO DA LITERATURA	25
Carcinoma de tireoide	25
Proliferação Celular	29
Apoptose – Mecanismos de morte celular	32
Angiogênese –VEGF e seus receptores	42
MATERIAL e MÉTODOS	47
RESULTADOS	58
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	96
Aprovação do Comitê de Ética	96
ARTIGOS (Publicação final)	98

INTRODUÇÃO

Nódulo tireoidiano é um problema clínico comum que acomete cerca de 4 a 7% da população em áreas iodo-suficientes (1). Com base na histopatologia, essas lesões podem representar áreas hiperplásicas, adenoma ou carcinomas (1,2). Ainda que a avaliação diagnóstica pela punção aspirativa por agulha fina (PAAF) seja considerada o método de eleição, a citologia resulta em indeterminada em 10% a 30% dos casos, o que dificulta o manejo diagnóstico e terapêutico, sobretudo em relação à definição de se indicar ou não a abordagem cirúrgica (1-4). Depois de publicado o estudo de *Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology* (2), as lesões indeterminadas de tireoide foram classificadas em Bethesda III (atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado), IV (neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular) e, V (suspeito de malignidade), conforme Cibas e cols. (2). Em geral, 60-70% desses casos mostram ser lesões benignas no pós-operatório (1,3-7); o que reforça a necessidade de selecionar com maior precisão os pacientes candidatos à tireoidectomia na busca de se evitar condutas agressivas e desnecessárias em casos de baixo risco. Em contrapartida, faz-se necessário definir os casos de nódulos indeterminados considerados de alto risco e que precisem de conduta cirúrgica imediata. Estudos com ênfase em parâmetros suspeitos de malignidade à ultrassonografia (US) (3-7), bem como testes moleculares na citologia que auxiliem na definição de malignidade são cada vez mais frequentes em nódulos indeterminados da tireoide (8-11), visando auxiliar no manejo clínico e na maior precisão possível para a decisão por tratamento cirúrgico.

Na avaliação de pacientes com nódulos de tireoide destacam-se como preditores clínicos de risco para malignidade a idade inferior a 20 ou acima de 70 anos (1,10,11), a história familiar (parentes de 1º grau) e a história de prévia irradiação externa em área de cabeça e pescoço, conforme a maior parte dos consensos atuais (1,3,5,10,11). A análise laboratorial de pacientes com nódulo tireoidiano envolve avaliação da função tireoidiana, baseada em dosagens de concentrações séricas de hormônio tireoestimulante (TSH), tiroxina livre (T4L), e anticorpos marcadores de doença autoimune (DAT) da tireoide (1,3,5). McLeod e

cols. (2012) avaliaram 22 estudos envolvendo 40.929 indivíduos controles, em comparação a 5.605 casos de carcinoma diferenciado de tireoide (CDT) e verificaram associação positiva entre TSH acima de 3mU/L e malignidade, que resultou em “*odds ratio* (OR)” de 1.87 (12). Estudo prévio de nosso grupo (2011) não observou diferença entre as concentrações de TSH de pacientes com nódulos benignos ou malignos (13).

A US cervical é o método de imagem de escolha para o estudo dos nódulos de tireoide e permite avaliar o tamanho, a localização e as características sugestivas de malignidade (hipoecogenicidade, borda irregular, microcalcificações, linfonodopatia isolateral, “taller than wide”, hiperfluxo central ao doppler), bem como a identificação de linfonodos suspeitos (1,3,5,10,11). A US pode evidenciar o grau de suspeita do nódulo de tireoide para malignidade, além de permitir a realização da PAAF guiada (PAAF-US). Wienke e cols. (2003) evidenciaram ao menos um sinal de malignidade à US em 69% dos nódulos benignos investigados e, cerca de metade dos nódulos benignos eram hipoecóicos (14). Estudo prévio de nosso grupo verificou a associação de idade acima de 39 anos, diâmetro acima de 2cm, microcalcificações e borda irregular ao US como preditores de malignidade tireoidiana com acurácia de cerca de 82% (13).

Desse modo, na busca de se uniformizar a avaliação de risco de malignidade à US, foi desenvolvido o escore TI-RADS (*thyroid imaging reporting and data system*). O método foi inicialmente descrito por autores chilenos em 2009 (15), seguindo-se então de 4 grandes estudos no período entre 2009 a 2013 (16-19). A avaliação baseava-se na análise combinada de 10 critérios observados ao exame de US de nódulos tireoidianos acima de 0,5cm de diâmetro, o que tornava o método pouco atraente para a prática clínica (15). Em 2014, estudo francês de uma série prospectiva de 4550 casos estabeleceu um fluxograma para avaliação de risco de malignidade e indicação de PAAF-US em nódulos classificados como TI-RADS 4A (1 critério: hipoecóico leve), 4B (2 critérios: hipoecóico, microcalcificações, borda irregular ou “taller than wide”) e 5 (3 ou mais critérios); com alta sensibilidade (92%) na predição de malignidade em nódulos tireoidianos (19).

No entanto, o escore TI-RADS no modelo proposto não considerou alguns critérios sugestivos de malignidade em nódulos tireoidianos, como diâmetro, ausência do halo hipoecogênico e vascularização ao Doppler (1,3,6,10,11). Kamran

e cols. (2013) demonstraram a relação entre malignidade e diâmetro acima de 2cm em nódulos tireoidianos, pela revisão de 7.348 casos operados entre 1995 e 2009 (Harvard Medical School, Boston, USA). Os autores documentaram 13% de malignidade na amostra (913 casos), existindo associação significativa entre tumores acima de 2cm (20), dado não contemplado pelo escore TI-RADS. Além disso, os resultados de acurácia do escore TI-RADS foram validados com base apenas em comparação citológica não levando em consideração o resultado final da histologia em 263 casos operados, incluindo os de citologia indeterminada, em que a acurácia do método foi estabelecida em 62% (19). Apesar de quatro grandes estudos envolvendo a análise do escore TI-RADS para doença tireoidiana (15,17-19), a acurácia e impacto do método em nódulos com citologia indeterminada de acordo com a classificação de Bethesda se mostravam ainda pouco explorados na literatura.

Por outro lado, diversos estudos em nódulos com citologia indeterminada demonstraram ao menos uma mutação genética em 80-90% dos casos (8,9,21,22). O conhecimento sobre novos marcadores genéticos relacionados à carcinogênese tireoidiana mostra-se de grande interesse para se ampliar o arsenal diagnóstico em lesões indeterminadas, bem como auxiliar na diferenciação histológica de lesões foliculares, muitas vezes duvidosa, mesmo para patologistas experientes na área (21-24). A identificação de marcadores genéticos ou por imuno-histoquímica (IHQ) que permitam diferenciar lesões benignas e malignas da tireoide permanece como aspiração de longa data, em especial visando distinguir adenomas foliculares (AF) de carcinoma folicular da tireoide (CFT) e variantes foliculares do carcinoma papilífero da tireoide (CPT, CPTVF).

O conhecimento dos mecanismos biológicos envolvidos na progressão e morte celular mostra-se de fundamental importância para a compreensão adequada da evolução e história natural dos diferentes tipos de lesões benignas (autoimune, coloide, neoplásicas) e malignas (CDT) na tireoide. O processo neoplásico está associado a agressões ao material genético ao longo da vida, existindo provável desequilíbrio entre o estímulo à proliferação celular e/ou perda do bloqueio do ciclo celular com deficiências nos mecanismos de apoptose (21-25). Estima-se que proteínas relacionadas à angiogênese (VEGFs), controle do ciclo celular (Ki-67, p27, ciclina D1), e controle da apoptose (Fas/FasL, p53, p21 e Bcl-2) estejam envolvidas

em diversos mecanismos neoplásicos e não tumorais, como condições inflamatórias autoimunes, tireoidite de Hashimoto (TH) e doença de Graves (DG) (25-39). A maioria dos estudos disponíveis baseia-se em amostras relativamente pequenas, com ausência de padronização nos métodos (diversos anticorpos e diluições) e diferentes critérios de “*ponto de corte*” para definição de forte expressão, o que interfere diretamente na interpretação dos resultados e nas conclusões dos autores, tornando menos adequada a análise comparativa entre os marcadores utilizados por diferentes estudos, opinião corroborada por Kakudo e cols. (2015) em revisão, envolvendo especialmente a expressão de Ki-67 no prognóstico de lesões tireoidianas (40).

Particularmente, a forte expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*) foi relacionada a diversos tipos de neoplasias, como câncer gástrico, cervical, pulmonar e mama; e à piora de prognóstico e sobrevida em tipos específicos, como câncer ovariano, gástrico e cervical (36-39, 41-43). No entanto, o papel dessa proteína de bloqueio apoptótico na tumorigênese tireoidiana ainda é pouco explorado na literatura. Verificamos escassez de dados na literatura quanto ao perfil de expressão da proteína Mcl-1 na tireoide humana, assim como quanto a sua correlação com outros marcadores associados ao crescimento celular e apoptose. Além disso, a análise de marcadores moleculares na citologia permanece como objeto de interesse na busca de se incrementar a acurácia diagnóstica em nódulos com citologia indeterminada. O conhecimento de novos marcadores moleculares envolvidos na tumorigênese tireoidiana pode auxiliar na expansão de estudos relacionados ao prognóstico e evolução dos casos de câncer de tireoide, frente aos tratamentos ora existentes; e, sobretudo, casos avançados e refratários aos tratamentos já estabelecidos.

OBJETIVOS

A presente tese foi desenvolvida com objetivo de estudar fatores associados à malignidade em lesões tireoidianas neoplásicas (benignas e malignas) e não neoplásicas, avaliando características ultrassonográficas, citológicas e o perfil de expressão imuno-histoquímica de proteínas relacionadas à angiogênese (VEGFs), controle do ciclo celular (Ki-67, p27) e apoptose (Fas/FasL, Mcl-1 e Bcl-2).

Objetivos Específicos

1. Estratificar o risco de malignidade pelas características ultrassonográficas, com base no escore TI-RADS, em nódulos de tireoide com citologia indeterminada (Bethesda III, IV, V); estabelecendo avaliação combinada TI-RADS / Bethesda.
 2. Avaliar o perfil de expressão de proteínas relacionadas à angiogênese (VEGFs), controle do ciclo celular (Ki-67, p27) e apoptose (Fas/FasL, Mcl-1 e Bcl-2) em lesões benignas e malignas na tireoide; e seu impacto no diagnóstico diferencial histológico;
 3. Correlacionar os resultados da expressão IHC de um painel de proteínas de apoptose, angiogênese e controle do ciclo celular com dados clínicos, citológicos e de imagem ultrassonográfica em nódulos benignos e malignos de tireoide.
-

REVISÃO DA LITERATURA

Carcinoma de Tireoide

O CDT é um tumor incomum e em geral, de bom prognóstico, com incidência estimada em 1 a 10 casos / 100.000 pessoas na maioria dos países. Trata-se da neoplasia endócrina mais comum em todo o mundo, mas representa apenas 1% de todas as malignidades (1,5,10,44). Os tumores malignos da tireoide têm como origem as células foliculares (CDT), parafoliculares (carcinoma medular de tireoide, CMT) e tumores de origem extra-tireoidiana, como linfomas e metástases de outros sítios neoplásicos. As células foliculares constituem a quase totalidade dos elementos celulares da tireoide, sendo responsáveis por 90% dos carcinomas tireoidianos, denominados bem diferenciados. Esse grupo de tumores se subdivide em carcinoma papilífero e folicular. Os carcinomas indiferenciados ou anaplásicos representam menos de 5% dos casos. Os casos de CMT podem ocorrer de forma esporádica ou familiar (1,3,5,10,11). Alterações moleculares distintas ou prevalentes em um ou outros destes tumores sustentam o modelo de progressão tumoral no câncer de tireoide. Em geral, os carcinomas derivados do epitélio folicular são de bom prognóstico e potencialmente curáveis por tratamento cirúrgico, seguidos ou não por radioiodoterapia (1,10,21,44).

Estima-se que a popularização do uso dos métodos de imagem, sobretudo a US, e a facilidade de acesso à citologia através da PAAF contribuíram para o aumento progressivo do número de diagnósticos de casos de CDT de pequeno tamanho (5-8). Assim sendo, carcinomas menores do que 1 cm de diâmetro são achados cada vez mais comuns em nosso meio, diagnosticados muitas vezes de forma inesperada ("incidentalomas"), através da US ou ao exame histopatológico da glândula operada devido a doença benigna, como em casos de obstrução de vias áreas, bócio volumoso e hipertireoidismo descompensado (10,11).

Estudos envolvendo marcadores genéticos ou IHQ que auxiliem no diagnóstico de lesões benignas e malignas da tireoide, muitas vezes de difícil caracterização mesmo para patologistas experientes, vêm aumentando progressivamente nos últimos anos (22-27). Nos casos de CPT destacam-se as

translocações e inversões que levam aos rearranjos moleculares do gene RET (*rearranged during transfection* - RET), com genes heterólogos que levam a formação do complexo RET/PTC; além das mutações ativadoras e translocações que envolvem os genes BRAF (RAF quinase tipo Beta) e RAS (9,21,22). Em CFT, destacam-se estudos com a detecção das mutações ativadoras do gene RAS e da proteína oncogênica resultante da fusão PAX8-PPAR gama. Nos casos de CMT familiares, destacam-se as mutações ativadoras do gene RET, e, nos carcinomas anaplásicos, as mutações no gene p53 (26).

A patogênese da formação do nódulo tireoidiano / bócio multinodular (BMN) e os mecanismos de apoptose e angiogênese envolvidos em sua evolução, progressão e/ou involução, vem sendo extensamente estudados e ainda não são consenso na literatura (27-29). A fusão do domínio tirosina-quinase com as sequências terminais 5' de genes heterólogos expressos nas células foliculares, que resulta na formação de oncogenes e proteínas quiméricas conhecidas como RET/PTC, e as mutações ativadoras do gene BRAF constituem as duas alterações genéticas mais frequentes e independentes detectadas em casos de CPT (9,45).

Dentre os marcadores mais estudados, a mutação BRAF^{V600E}, condição característica do CPT, tem permitido elevar a taxa diagnóstica em nódulos com citologias indeterminada ou suspeita para malignidade (45-48). O gene BRAF pertence à família das proteínas RAF (ARAF, BRAF, CRAF), sendo o responsável pela codificação de uma serina/treonina quinase citoplasmática e é a isoforma predominante nas células foliculares da tireoide. Essa isoforma BRAF é altamente expressa em neurônios, testículos e em menor escala, nas células hematopoiéticas e tireoidianas. A mutação BRAF^{V600E} é a mutação mais encontrada no CPT clássico, micro-CPT, bem como nas variantes de células altas (45-48). Essa mutação corresponde a uma transversão de timina para adenina, no nucleotídeo 1799 do éxon 15 do gene BRAF, que resulta na substituição do aminoácido valina pelo glutamato no resíduo 600 da proteína correspondente (V600E), com prevalência de 29 a 83% dos casos (48). Estima-se não haver concomitância de ativação de vias entre os genes BRAF, RAS e RET/PTC. Kimura e cols. verificaram mutação no gene BRAF em 22 de 66 casos de CPT estudados (33%), sem nenhuma mutação detectada nos genes RAS e RET/PTC; além de alteração genética da via RET/PTC

em 16% desses casos, também de forma isolada, sem acometimento das vias BRAF e/ou RAS, simultaneamente (49).

A mutação BRAF^{V600E} representa uma das principais vias oncogênicas no CPT, cuja tumorigênese se relaciona à ativação da via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). A detecção de mutação BRAF^{V600E} em casos de CPT vem sendo descrita como um fator importante de pior prognóstico e aumento de mortalidade (48,49). Estudo retrospectivo, multicêntrico, realizado em 8 diferentes países e 16 centros, com 2099 pacientes submetidos à tireoidectomia seguido de ablação com radioiodo (RIT) evidenciou a presença de mutação BRAF em 48,5% (1017/2099 casos); com taxa de recorrência de 20,9% do grupo BRAF (+) vs. 11,6% grupo BRAF (-); incluindo casos de micro-CPT e baixo risco (estádios I e II). Os autores consideraram a mutação BRAF^{V600E} como marcador independente de pior prognóstico e recorrência em pacientes com CPT (48).

Esse conhecimento permitiu o desenvolvimento de testes moleculares em material de citologia (PAAF) na busca de se aumentar a acurácia diagnóstica em casos de nódulos com citologia indeterminada. Nikiforov e cols. (46) estudaram 470 amostras de citologia de 328 pacientes, quanto à presença de mutações dos marcadores BRAF, RAS, RET/PTC e PAX8/PPAR gama. A mutação BRAF foi a mais comum, sendo que a presença de qualquer mutação confirmou o diagnóstico de malignidade em 97% dos casos, com base na correlação histopatológica. Estima-se que a presença de mutação ativadora do gene RAS culmine com a ativação inapropriada da via RET quinase que está geralmente presente em CPT, também descritas em cerca de 30 a 40% dos casos de CFT (45,49). Estima-se que as alterações genéticas dos genes RAS, RET/PTC e BRAF resultem na ativação constitutiva de proteínas efetoras da via de sinalização MAPK, culminando com a sequência de transformação maligna da célula tireoidiana, presentes, em geral, em cerca de 70% dos casos de CPT (49).

Nos casos de CFT, a patogênese do câncer ainda é motivo de discussão na literatura, não sendo tão bem estabelecida quanto em casos de CPT, com destaque para as alterações dos genes PAX8 e RAS. A fusão dos genes PAX8 (*paired-box gene 8*) e PPAR-gama resulta da translocação t(2;3)(q13;p25) descrita em adenomas e carcinomas foliculares, presentes em cerca de 10% a 63% desses casos (45,46), mais frequentemente nos carcinomas do que em adenomas foliculares (49). O gene PAX8 é um importante fator de transcrição relacionado com

a expressão de genes envolvidos na atividade funcional fisiológica da tireoide, através da regulação de genes da expressão de TG (tireoglobulina), TPO (tireoperoxidase) e NIS (simportador sódio/iodeto) (45-49).

Em acordo com os dados de Puglisi e cols. (24) avaliados em 73 nódulos de tireoide, há associação de expressão mais intensa de PAX8 em lesões benignas em relação às malignas, com positividade variando de 10% a 40% em casos de AF *versus* de 0 a 16,9% nos casos de CPT. Marques e cols. (50) analisaram a expressão IHQ de PAX8-PPAR gama em 34 nódulos operados, sendo positiva (difusa e nuclear) em 78% (7 de 9) dos carcinomas foliculares, 31% (5 de 16) dos AF e 11% (1 de 9) dos casos de CPT. Os autores sugerem a aplicabilidade do estudo de material de PAAF com análise do PAX8-PPAR gama como guia diagnóstico na discriminação das “neoplasias foliculares”.

Zhu e cols. (2010) estudaram a imuno-expressão dos marcadores RET, CK19 (citoqueratina 19), Galectina 3 (Gal-3) e HBME-1 (*Hector Battifora Mesothelial-1*) em 155 nódulos malignos (CPT) operados. A expressão de CK19 foi significativamente maior em casos de CPT variante folicular em relação ao carcinoma folicular, além de expressão difusa e intensa de CK19 e RET em casos de PTC, mas fraca e focal em casos de nódulos benignos (25).

Finley e cols. (2004) avaliaram o poder de discriminação entre nódulos benignos e malignos pela análise do perfil molecular da lesão. Ao comparar 33 nódulos malignos (n=9, CFT; n=24, CPT) e 26 benignos (AF e nódulo hiperplásico), os autores criaram uma lista de genes potenciais, com destaque para Gal-3, baseados em 45 amostras e verificaram uma sensibilidade para câncer de 91,7% e especificidade de 96,2% (51).

Quanto à via da proteína RAS, uma vez ativada, é desencadeada a via de sinalização intracelular ERK-MAPK. As mutações do gene RAS são frequentes em diversos tipos de tumores humanos (30%), inclusive em doenças da tireoide, sendo tais mutações em geral detectadas nos códons 12, 13 e 61 (26,31,47). Os tipos histológicos de carcinoma tireoidiano que mais sofrem mutações do RAS são o carcinoma anaplásico (58%), seguido pelo tipo folicular em cerca de 1/3 dos casos (30%-35%), AF (35%) e CPT (18%) (46,49,52).

Os avanços nos estudos de marcadores genéticos e de expressão IHQ são de grande importância, mas ainda carecem de estudos para a efetiva compreensão dos mecanismos envolvidos no crescimento e morte celular, sobretudo relacionado

às doenças benignas e malignas da tireoide e seu impacto no prognóstico especialmente em casos de carcinoma tireoidiano.

PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular; que envolve uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, que assegura a duplicação fiel dos componentes celulares em uma sequência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas. A existência de falhas neste sistema, seja por estimulação excessiva do crescimento ou falência no bloqueio de proliferação celular, permite que células geneticamente anormais dividam-se, gerando danos genéticos cumulativos, e consequente início da progressão das neoplasias (31-35,53).

Os marcadores de proliferação celular podem ser classificados em três níveis: 1) marcadores de fração de crescimento; 2) marcadores de fases específicas do ciclo celular e; 3) marcadores de tempo de ciclo celular (53-59). A regulação do ciclo celular é baseada na ação de proteínas quinases específicas, CDK (*cyclins dependents of kinases*), cuja regulação por fosforilação é feita pelas ciclinas. Estas proteínas, em geral, ocorrem ciclicamente, e são ativadas e degradadas durante o ciclo celular. As ciclinas podem ser classificadas em proteínas tipo mitóticas e ciclinas G1, com importante função na entrada da célula na fase S (55-58).

O ciclo celular consiste em uma fase de repouso (G0), de duração variável, onde não há atividade proliferativa pela célula (40). Com base em estímulos específicos, a célula inicia o processo de ciclo proliferativo pela fase G1 (*first gap*), também de duração variável, em que a célula se prepara para a próxima fase, a fase S (*synthesis*). Nessa fase, ocorre a síntese do DNA e a duplicação genômica, com duração de cerca de 12 horas. Após o período de intensa produtividade, segue-se a fase G2 (*second gap*), marcada pela aparente inatividade, com duração variável de 1 a 6 horas, em geral. Nesse período, a célula está novamente se programando para o próximo passo, em que promoverá a divisão das cromátides (fase M, *mitosis*), por uma a duas horas. Concluída tal etapa, as novas células-filhas podem então seguir para nova fase G0 ou G1, dando início ao ciclo celular (40,55-59).

Ki-67 é um antígeno nuclear expresso durante todo o ciclo celular (G1,S,G2,M), com exceção da fase G0, sendo um marcador de proliferação celular descrito em lesões benignas e malignas de tireoide (26,31,40,56-59). Seu gene encontra-se no cromossomo 10 e consiste em 15 éxons com 30.000 pares de bases que transcrevem duas formas predominantes, uma de 320 e outra 359 kDa. Sua estrutura é formada por 10 supostas sequencias nucleares, 143 sítios potenciais de fosforilação de proteína quinase C, 2 sítios de tirosina quinase e 8 sítios para CDKs. O anticorpo monoclonal MIB-1 representa um fragmento do antígeno Ki-67, sendo utilizado como marcador de atividade proliferativa celular através da identificação da expressão de um antígeno presente nas fases G1, S e G2 do ciclo celular (26,33,56,59). Ki-67 encontra-se predominantemente no nucléolo, concentrando-se na periferia dos cromossomos durante a dissociação nuclear na mitose (40).

A expressão da proteína Ki-67 como marcador de proliferação celular vem sendo analisada em diversos tipos de tumores, havendo dados ainda controversos em neoplasias tireoidianas. Müller-Höcker (58) estudou a expressão de Ki-67 em 17 espécimes de DTC em comparação com 20 casos de AF. Os autores observaram maior expressão de Ki-67 em lesões malignas, sobretudo na presença de metástase, em relação aos tecidos malignos sem metástase e lesões benignas.

Siironen e cols. (32) mostraram que tumores malignos de tireóide (CPT) em indivíduos acima de 55 anos de idade na época de diagnóstico, apresentam maior expressão de Ki-67, em função da maior idade, sugerindo que esses tumores tireoidianos sejam mais agressivos e de rápido crescimento nesse grupo de pacientes. Tais achados encontram-se em consonância com os dados previamente publicados por Tallini e cols. (59); em estudo de 90 casos de CDT estratificados por grupos em relação ao prognóstico: lesões bem ou pouco diferenciadas vs. indiferenciadas (carcinoma anaplásico); verificando associação de baixa expressão de p27 e alta expressão de Ki-67 com piora de sobrevida nos casos avançados.

Saiz e cols. (26) avaliaram a expressão de anticorpo Ki-67 (monoclonal, diluição 1:50) em 19 casos de CPT e 10 espécimes de AF. Verificaram aumento progressivo de positividade para Ki-67 a partir das áreas de tecido tireoidiano normal, seguindo-se adenomas, CFT e CPT, apresentando sensibilidade de 63,1% e acurácia de 72,4% em discriminar lesões benignas e malignas. Estima-se que o marcador Ki-67 seja eficaz na diferenciação entre as lesões foliculares, especialmente em casos avançados (metastáticos) de CFT em relação aos de AF

(58,59). No entanto, outros autores não encontraram associação entre a expressão de Ki-67 e lesões malignas na tireoide. Mar e cols. estudaram em população japonesa a expressão de Ki-67 (clone MIB-1 monoclonal; DAKO, diluição 1:50) em 20 AFs e 22 CFT minimamente invasivos; não sendo observada diferença significativa entre os grupos (31).

Mazeto e cols. (60) estudaram os impactos do tratamento clínico para doença de Graves em 20 pacientes em uso de droga anti-tireoidiana seguidos por 4 e 12 meses quanto ao marcador de proliferação celular MIB-1 (Ki-67). Os autores observaram associação inversa entre o tempo de tratamento e a expressão do marcador MIB-1, com redução progressiva ao longo do tempo, indicando, portanto o status da evolução e tratamento da doença de Graves. A associação entre Ki-67 e a proteína anti-apoptótica Mcl-1 foi observada em 40 espécimes de câncer cervical, associados a pior prognóstico e menor sobrevida (38); associação ainda não estudada em lesões tireoidianas benignas ou malignas, conforme a literatura vigente.

Outra importante proteína associada ao crescimento celular e à tumorigênese em diversos tipos de câncer é a p27^{Kip1} (p27) que atua como inibidor da proliferação celular, cuja alteração ou supressão está diretamente relacionada ao crescimento celular desordenado e, logo, maior risco tumoral (28,33-35). Sua atividade biológica é tipo ciclina-dependente; atua na regulação da transição da fase G1 para S do ciclo celular através do bloqueio da atividade quinase do complexo ciclinaE/Cdk2 (25,47). Estima-se que a baixa expressão da proteína p27 acarrete perda do bloqueio do ciclo celular, possibilitando crescimento celular desordenado e caótico, associado a diversos tumores no ser humano. Um dos mecanismos prováveis para essa baixa expressão de p27 está relacionado à ação da proteína citoplasmática Jab1, cuja forte expressão IHQ foi observada nas áreas de infiltrado tumoral associada a baixa expressão da proteína p27 em 50 espécimes de CPT (61). Estudos prévios demonstram forte expressão da proteína p27 em tecidos tireoidianos normais e na hiperplasia da doença de Graves (28,59). Troncone e cols. (2007) demonstraram que a presença de ciclina D3 em altos níveis proporciona maior expressão de p27, estimando-se que sejam casos de CFT de mais baixo risco (62).

Karlıdag e cols. (35) compararam a expressão da proteína do ciclo celular p53, anti-apoptótica Bcl-2 e a expressão concomitante da proteína p27 em pacientes portadores de CPT com (n=15) e sem metástase linfonodal (n=13); descrevendo a

proteína p27 como um importante marcador de tumores avançados e mais indiferenciados, associados a maior progressão da doença, em consonância com os dados prévios de Tallini e cols. (59). Não houve correlação entre o marcador p53 e pior prognóstico do tumor (CPT com metástase), além de ser verificada maior expressão de p27 em tireoides normais em relação aos casos de CPT com metástase. Esses dados são corroborados por Khoo e cols. (34), em 22 casos de micro-CPT com metástase (T1N1), em comparação com 33 controles (micro-CPT sem metástase). A baixa expressão IHC de p27 (anticorpo monoclonal, BD PharMingen, 1:1000) foi predominante em 15/21 casos de CPT com metástase *versus* 6/33 do grupo controle (CPT sem metástase; $P < 0.001$). A associação com Ki-67 e p53 não foram significantes nesse estudo.

Outras associações com marcadores de neoplasias foram verificadas junto à expressão da proteína p27, como Gal-3 e mutações BRAF. A associação de baixa expressão da proteína p27 com Gal-3, perfil p27(+)/Gal-3(+), demonstrou alta sensibilidade (100%) e especificidade (97%) na diferenciação entre AF (n=22), CFT minimamente invasivo (n=13) e extensamente invasor (n=25) (55). A associação entre p27 e BRAF foi verificada em 88 casos de micro-CPT; sendo que o perfil IHC p27(+)/BRAF(+) se associou à extensão extra-tireoidiana e metástase loco-regional em casos de micro-CPT BRAF positivos (47).

A associação da expressão de ambos os marcadores de controle do ciclo celular, p27 e Ki-67 ainda é pouco explorada na literatura em concomitância com marcadores de apoptose e angiogênese, em diferentes lesões tireoidianas, neoplásicas e não tumorais.

APOPTOSE – Mecanismos de Morte Celular

A homeostase tissular depende diretamente do balanço entre proliferação e morte celular, sendo, portanto, um dos processos biológicos mais fundamentais na tumorigênese humana. O desequilíbrio de controle do ciclo celular proporciona uma distribuição aberrante de material genético nas células filhas, contribuindo para um ambiente de instabilidade genômica, e consequente evolução de neoplasias (22,39). O termo “apoptose” foi inicialmente descrito por Kerr, Wyllie e Currie em 1972,

quando avaliaram cultura de células hepáticas com detalhes de sua dinâmica de sobrevivência celular (39,43).

Apoptose consiste em um processo ativo (gasto energético) de conservação celular programada, através de identificação e eliminação constante de células infectadas e/ou desnecessárias, em excesso ou com defeito genético (39,53). Durante esse processo, ocorre condensação do citoplasma e núcleo, agregação de mitocôndrias e ribossomos, bem como de cromatina, seguida de morte celular. Após a destruição celular, segue-se a formação de corpos apoptóticos (fragmentos celulares), sendo o DNA cromossomal clivado em fragmentos de 180-bp. Defeitos no mecanismo de apoptose estão relacionados com o aparecimento de inúmeras doenças, secundárias à hiperplasia e neoplasia decorrentes do crescimento celular desordenado (22,53).

Em geral, a apoptose ocorre por duas vias clássicas: a via intrínseca e a via extrínseca do receptor de morte celular. A via intrínseca envolve a ativação do citocromo C, em nível mitocondrial, pela formação de um complexo multiproteico denominado “apoptosome”; ativado por proteínas homólogas do domínio 3 do gene Bcl-2 (63-66). As vias do receptor de morte celular são ativadas ou pelo acoplamento do Fas-Fas ligante (FasL), ou através do TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), levando à ativação da cascata de enzimas caspase (“cysteine **aspartate-specific protease**”), mitocôndrias, proteínas da família Bcl-2 e morte celular (65,66).

Dados da literatura identificam uma série de marcadores envolvidos nos processos de apoptose e proliferação celular; além dos descritos Fas (APO-1/CD95) e TRAIL, sabidamente indutores de apoptose, destacam-se outros marcadores, como o gene p53, Bcl-2, Mcl-1 (*myeloid cell leukemia-1*) e proteínas anti-apoptóticas membros da família do complexo F-box (22,39,53,63-66). O genoma humano engloba 68 proteínas putativas do complexo proteico F-box, cujas funções no controle do ciclo celular não estão ainda completamente estabelecidas (39,43). Fbw7 é um dos genes mais importantes no complexo F-box, relacionado a mecanismos de apoptose em diversos tipos de tumores. Estima-se que o gene Fbw7 atue na regulação da c-Jun através da via da proteína “Glycogen Synthase Kinase” (GSK3) (67). A inativação do gene Fbw7 parece desencadear aumento de expressão da proteína Mcl-1, importante marcador anti-apoptose relacionado a

diversos tipos de tumores, associado à inativação concomitante de proteínas indutoras de apoptose Bim, Bax e Bak (Figura 1).

A proteína Mcl-1 foi inicialmente descrita em linhagens de células tumorais de leucemia mielóide (41) e é parte das proteínas pertencentes à “família Bcl-2”, conjunto de proteínas oncogênicas relacionadas tanto ao bloqueio apoptótico quanto à indução de morte celular. A identificação inicial da relação entre as proteínas da família Bcl-2, apoptose e câncer data dos anos 80, quando foram publicados os primeiros estudos envolvendo translocações dos cromossomos 14 e 18. Tais alterações apresentavam sua ação predominante em nível mitocondrial (66) tornando-se importante alvo para o arsenal diagnóstico em diversos tumores, além de possibilidade terapêutica no desenvolvimento de drogas anti-neoplásicas, que atuem na indução de apoptose. As proteínas constituídas por pelo menos 1 de 4 sítios (domínios BH1-BH4) em homologia com a proteína Bcl-2 são englobadas na “família Bcl-2” como as proteínas bloqueadores da morte celular: Mcl-1, Bcl-2, Bcl-B, Bcl-w e Bcl-X_L; e as proteínas indutoras de apoptose, Bcl-X_s, Bim/Bax; Bak, Bok (Figura 1) (39,66).

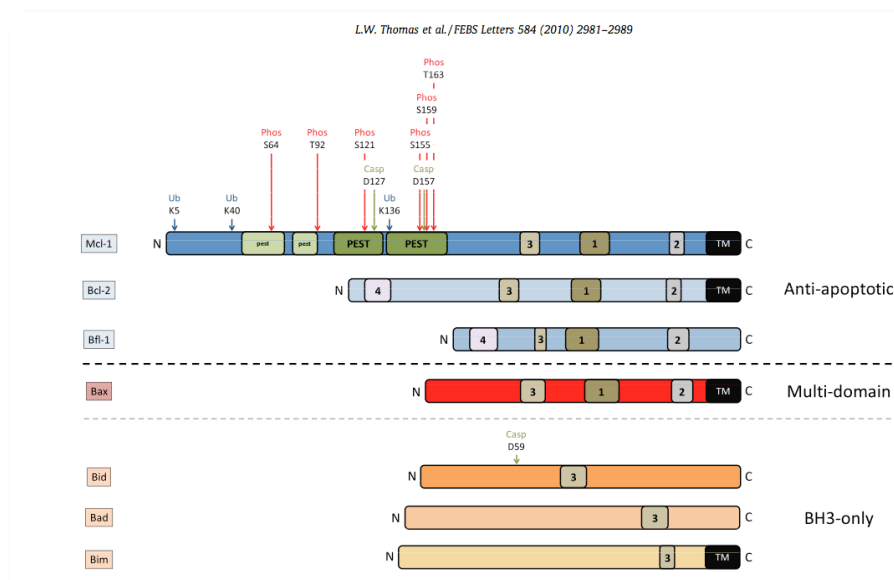


Figura 1. Ilustração esquemática da estrutura da proteína Mcl-1. A proteína Mcl-1 possui domínio transmembrana (TM) na porção carboxi-terminal, semelhante ao Bcl-2; com domínios BH1-4; é uma proteína maior, apresentando 2 regiões PEST responsáveis pela ação de caspases e reações de fosforilação que sinalizam para o bloqueio ou indução apoptótica. Adaptada de: FEBS letters 2004.

O gene Mcl-1 codifica em uma proteína de 37-kDa, com atividade predominante anti-apoptótica na célula, especialmente, as de cadeia longa, com importante homologia com a proteína Bcl-2 em 35% de sua estrutura polipeptídica de 350 aminoácidos, principalmente na área transmembrana (TM), porção carboxi-terminal (39,66-68); em comparação com os 239 resíduos da proteína Bcl-2 e 233 para Bcl-XL. Ou seja, a proteína Mcl-1 se destaca da família Bcl-2 por ser uma proteína maior, constituída de duas regiões específicas PEST (prolina, ácido glutâmico, serina e treonina). Nessas regiões ocorre grande parte das interações proteicas oriundas de reações de caspases e fosforilação que levam a maior ou menor estabilidade da proteína Mcl-1, bem como sua atividade pró- ou anti-apoptótica (Figura 1). Estima-se que ação indutora pró-apoptótica de Bax e Bak é estimulada por uma subdivisão de proteínas da família Bcl-2 com homologia 3, chamadas domínio isolado BH3 (39,65,69).

O domínio BH3 mostra-se essencial para atividade indutora apoptótica em todos os membros da família de proteínas Bcl-2, incluindo uma porção “pequena” da proteína Mcl-1 (Mcl-1 *short*, Mcl-1S). Bae e cols. (70) descreveram na placenta humana uma variante da Mcl-1 secundária a perda do exon 2 durante o processamento do mRNA; ocasionando perda da área TM e dos domínios BH1 e BH2; resultando em uma proteína Mcl-1 “pequena” (Mcl-1S) conhecida como isoforma 2. Uma segunda proteína Mcl-1 reduzida ocorre quando há perda do exon 1 e remoção de 53 aminoácidos da região PEST, mantendo os três domínios (BH1-3); denominado de Mcl-1_{ES} (extra-pequeno, ou isoforma 3). Em ovários de ratas chinesas, os autores evidenciaram atividade pró-apoptótica estabelecida pelo domínio BH3 para a proteína Mcl-1S e Mcl-1_{ES}, em oposição ao mecanismo anti-apoptótico da proteína predominante Mcl-1 “*Large*”, ou seja, fração longa de Mcl-1 (Mcl-1L), chamada isoforma 1 (70).

Diversos estudos buscam ampliar o conhecimento sobre o controle da atividade Mcl-1 em tecidos humanos e sua relação com as neoplasias. A proteína Mcl-1 atua na promoção do crescimento celular através da redução do índice de perda celular presente em diversos tecidos humanos, como ovários, próstata, mama, endométrio, epiderme, estômago e pulmões (36-43).

Estima-se que a expressão de Mcl-1 e Bcl-2 ocorra em sentidos opostos, sendo a expressão de Bcl-2 maior em tecidos pouco diferenciados, na membrana basal e que interage com a proteína Bad. Por sua vez, Mcl-1 se mostra mais

expressivo em tecidos bem diferenciadas no ápice das células epiteliais, sendo estimulado por uma série de citocinas como as interleucinas (IL)-3, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, alfa-interferon; proteínas VEGF, vias MAPK, fofatidil-inositol-3-quinase (PI3K)/Akt e via da família de proteínas JAK/STAT (*signal transducers and activators of transcription*), relacionadas com a ação e expressão de Mcl-1 em diversos tecidos humanos (65,68,71), Figura 2.

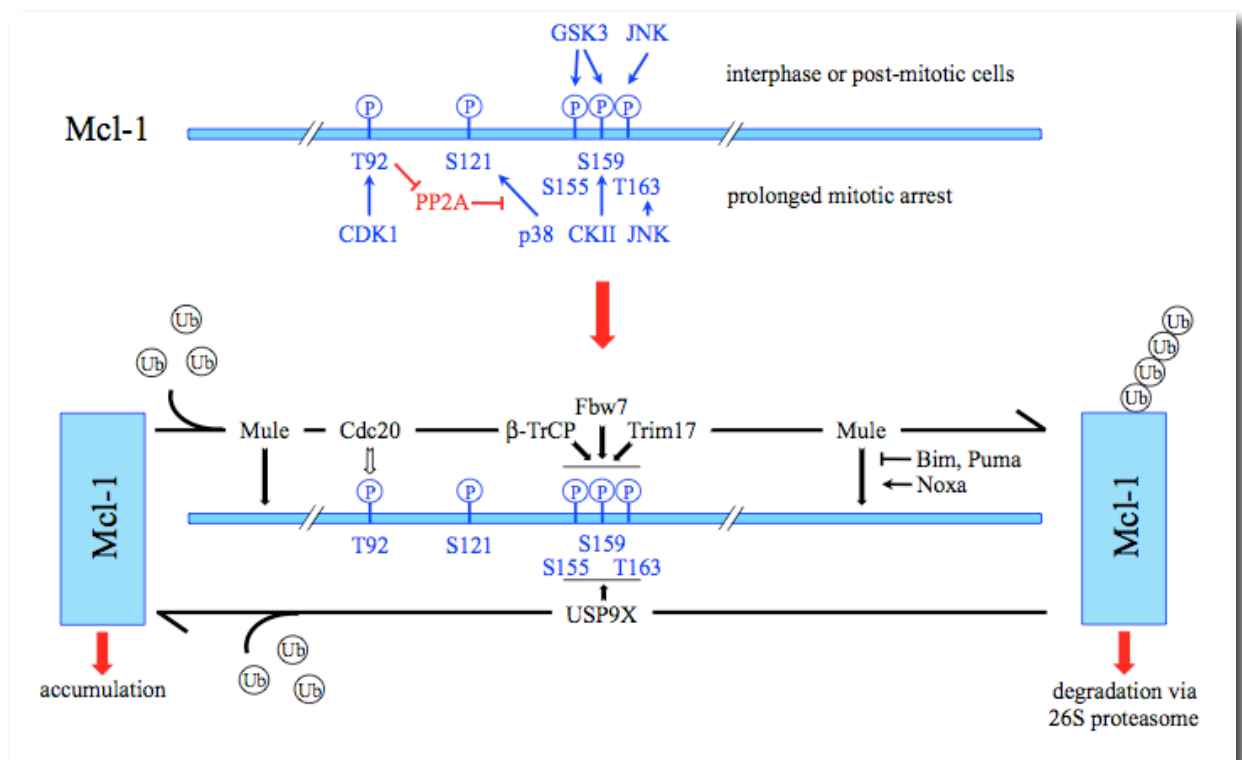


Figura 2. Ilustração esquemática da estrutura e regulação da estabilidade da proteína Mcl-1. A proteína Mcl-1 é fosforilada por diversas proteínas quinases (em azul). Nas fases intérfase e pós mitose, a via JNK promove fosforilação do resíduo Thr163 (treonina) que sinaliza para via GSK3 nos resíduos Ser159 e Ser155. Adaptada de: Cells 2014; 3: 418 – 37.

Um dos mecanismos mais bem documentados até o momento para a resistência à apoptose induzida pelo Mcl-1 parece estar relacionado a sua ação mediada pelo citocromo C em nível mitocondrial, promovendo inibição (“sequestro”) das proteínas Bak e Bax, indutoras de morte celular (71-73). A perda de atividade dos genes de supressão tumoral, Fbw7 e PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), parece se relacionar a inativação da cascata de reações inibitórias mediada pela

proteína GSK3 (Figura 3), que proporciona expressão aberrante da proteína Mcl-1, envolvida consequentemente no bloqueio do ciclo e morte celular. O gene PTEN é um regulador negativo da via PI3K/Akt e a perda de atividade PTEN está envolvida em diversos tipos de neoplasias, incluindo lesões metastáticas em linfonodos de casos de CPT (39,71,72).

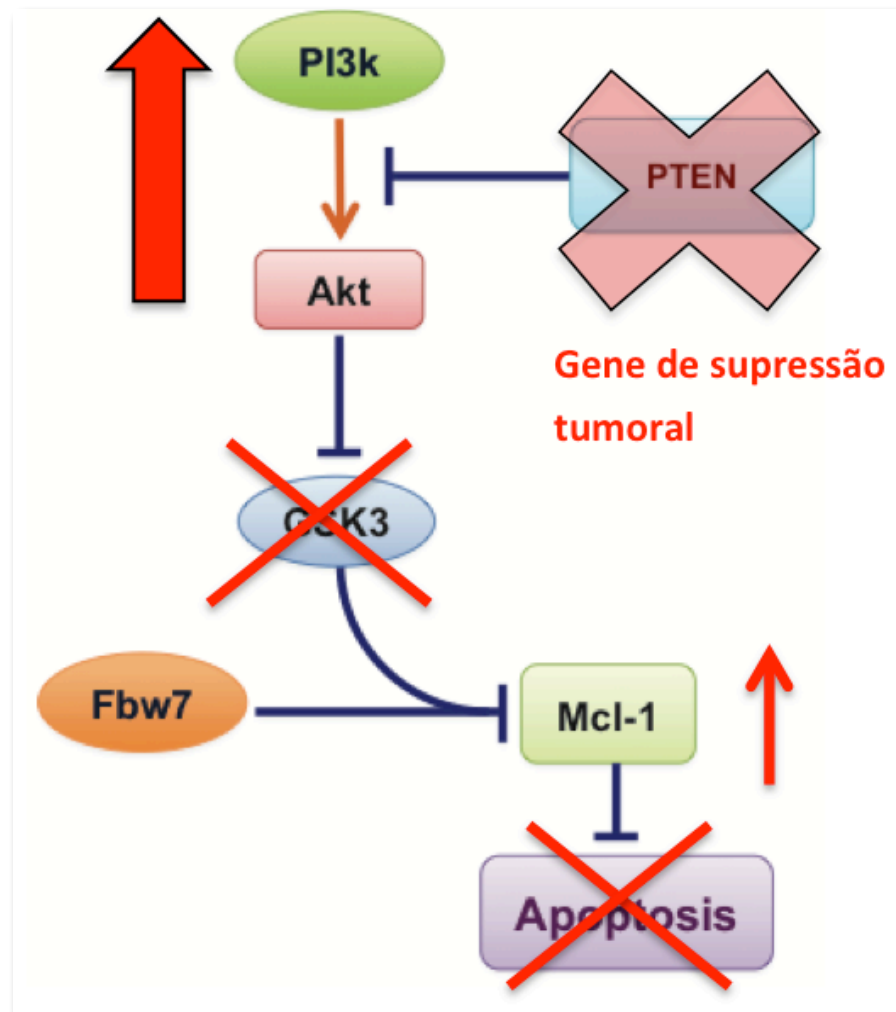


Figura 3. Esquema da ação potencial do complexo PTEN/PI3K/Akt sobre a via GSK3 – Fbw7 mediando a atividade Mcl-1. A perda de ação PTEN ocasiona ativação aberrante da via PI3K/Akt, com uma cascata de reações que resulta na inativação GSK3; cuja fosforilação no sítio Ser¹⁵⁹ reduziria a interação Mcl-1 com Bim e a expressão de Mcl-1, com consequente morte celular. Com a perda da ação da via GSK3 sobre Mcl-1, há subsequente aumento aberrante de sua expressão (Mcl-1L); com consequente bloqueio apoptótico, possibilitando o crescimento tumoral. Adaptada de Inuzuka et al. Oncotarget 2011; 2: 239 – 244.

Outro mecanismo pelo qual a proteína Mcl-1 ocasiona bloqueio do ciclo celular está relacionado à interação com proteínas CDK-1, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e “*checkpoint 1 protein*” (CHK-1). Nos últimos anos, diversos estudos evidenciaram expressão elevada da proteína Mcl-1 em tumores mais agressivos e relacionados à piora de sobrevida em casos de câncer de mama, ovário, gástrico e cervical. Baekelandt e cols. (74) verificaram a presença de forte expressão de Mcl-1 (anticorpo policlonal; diluição 1:25) em 53% dos casos de câncer ovariano, com piora de sobrevida em 5 e 10 anos de seguimento no grupo Mcl-1 positivo em relação aos tumores Mcl-1 negativos; dados semelhantes aos descritos para tumores cervicais e câncer gástrico avançado (37,38).

Zhang e cols. (38) estudaram a expressão de Mcl-1 (policlonal; diluição 1:50) e Ki-67 (diluição 1:200, Abcam, USA) concomitantes em 40 casos de carcinoma cervical. A presença de Mcl-1 fortemente expresso (> 51% da amostra) foi observada em tumores mais avançados, com diâmetro superior a 2,5cm e presença de metástase linfonodal. O perfil IHQ Mcl-1(+)/Ki-67(+) se associou à piora de sobrevida e prognóstico nesses casos.

Krajewski e cols. (36) avaliaram diversos tecidos humanos por IHQ e expressão de RNA envolvendo o sistema endócrino (pâncreas, adrenais, e tireoide) oriundos de autópsias de pacientes sem doença tireoidiana previamente documentada. A expressão de Mcl-1 mostrou-se forte e difusa em pâncreas e adrenais (zona glomerulosa), e baixa ou ausente no tecido tireoidiano normal (36). Nas duas últimas décadas diversos estudos evidenciaram a relação da forte expressão da proteína Mcl-1 em casos de câncer de mama, ovário, gástrico e cervical, com impacto significativo no prognóstico e piora de sobrevida (37-39,74); o que motivou à realização de um estudo mais amplo sobre o perfil de expressão da proteína Mcl-1 em lesões malignas bem diferenciadas e diferentes lesões benignas de tireoide, dados ainda pouco explorados na literatura.

A proteína Bcl-2, propriamente dita, consiste em uma proteína de 26-kDa, com atividade anti-apoptótica na célula exercida por intermédio de uma proteína citoplasmática presente nas mitocôndrias que apresenta a função de aumentar a sobrevivência da célula pela inibição da apoptose (63-66). Atua na promoção do crescimento celular por redução do índice de perda celular semelhante ao mutante p53 (66), estando o Bcl-2 presente em tumores de tireoide e, principalmente, nas leucemias linfocíticas e câncer pulmonar. Trata-se de importante mecanismo de

resistência à ação de diversos quimioterápicos, ainda que não exerça papel fundamental na tumorigênese envolvida.

Puglisi e cols. (24) verificaram expressão elevada de Bcl-2 associada à expressão de PAX-8 em 23 casos de CPT e 16 casos de CFT quando comparados à 11 AFs e 11 casos de bócio. Assumpção e cols (tese, 2001) estudaram 42 espécimes de CPT em comparação com 15 controles benignos (6 adenomas, 5 bócio e 4 tireoides normais), observando forte expressão IHQ da proteína Bcl-2 (anticorpo DAKO, diluição 1:40) em 30 casos malignos (71,4%). Os autores consideraram como positiva qualquer expressão de Bcl-2 em citoplasma nos espécimes avaliados. Os resultados demonstraram ausência de associação entre expressão de Bcl-2 e piora de prognóstico ou mortalidade em casos de CPT (75).

Karlidag e cols. (35) não verificaram diferença na expressão de proteína Bax indutora de apoptose em casos de CPT com ou sem metástase; em concordância com os resultados prévios da literatura demonstrados em 17 espécimes de DTC metastáticas ou não quando comparados com 20 casos de AFs (58).

Viacava e cols. (56) avaliaram os marcadores de proliferação celular, apoptose e angiogênese em AF funcionantes e não funcionantes, por estudo IHQ e genético. Foram investigados os anticorpos MIB-1 (Ki-67), Bcl-2, mutante p53, fator A vascular de crescimento endotelial (VEGF-A) e Gal-3. Os resultados não mostraram diferença quanto aos marcadores de apoptose (mutante p53 e Bcl-2) e de angiogênese (VEGF-A) em relação a nódulos funcionantes ou não funcionantes. Ki-67 (MIB-1) foi o único marcador com diferença estatística entre os tipos de AF. As mutações no receptor de TSH (TSH-r) foram encontradas em 12/15 adenomas funcionantes, na ausência de Gs-alfa e mutação RAS. Os autores concluíram ser a mutação do receptor de TSH a única diferença significativa entre adenomas funcionantes e não funcionantes quanto ao *status* hormonal do tumor e a atividade proliferativa. Nesse estudo não foi encontrada correlação entre os marcadores de apoptose e angiogênese em AF funcionante ou não. Portanto, verificamos que os dados a cerca do papel de proteínas bloqueadores da morte celular, pertencentes à família Bcl-2 permanecem controversos e não consistentes, sendo que novos estudos envolvendo esses marcadores poderiam auxiliar na compreensão da atividade dessas proteínas em diferentes lesões benignas e malignas da tireoide, contribuindo para novas estratégias diagnósticas e terapêuticas.

Os dois mecanismos indutores de apoptose mais comumente estudados atualmente na homeostase tireoidiana são a via do FasL e do TRAIL (63,64). Fas-ligante e TRAIL são membros da família TNF e atuam como proteínas de membrana tipo I, chamados de receptores de morte celular (63,75,76). Estudos prévios demonstram que o Fas é expresso principalmente em linfócitos T ativados e células imunológicas órgão-específicas, além das células “natural killer – NK”. Atuam diretamente na citotoxicidade e homeostase imune através da ativação de células imunológicas em fase final de processos inflamatórios (64,75).

Estudo turco comparou a expressão do gene FasL em 45 casos de CPT em relação a 100 voluntários saudáveis, avaliando o polimorfismo do gene Fas 670 A/G e FasL 843 C/T. Os autores não verificaram diferença no polimorfismo genético entre os grupos, tampouco relacionado ao diâmetro da lesão (77). Adicionalmente, Mitsiades e cols. (64), em estudo com população de nódulos de natureza benigna e autoimune (n=15) verificaram alta taxa de apoptose (cerca de 30%), marcada por expressão intensa dos marcadores Fas e FasL nos tireocitos, associado a baixa expressão de Bcl-2, evidenciando o desequilíbrio no balanço entre morte e proliferação celular em casos de tireoidite de Hashimoto. Esse mesmo grupo, em 2002, verificou uma resistência à apoptose induzida por Fas e seu ligante (FasL) em linhagem de células foliculares de CPT, sendo os mesmos sensíveis à ação do TRAIL sobre os receptores de morte celular, DR4 e DR5, verificados em 10 de 12 casos estudados (83%) (78).

O TRAIL consiste em uma proteína transmembrana de 32-kDa, expressa em tecidos diversos, com atuação estimada de proteção celular em tecidos normais, através da remoção de células infectadas por vírus e neoplasias iniciais (79,80). A indução de apoptose ocorre pela interação com dois receptores de morte celular, DR4 (TRAIL-1) e DR5 (TRAIL-2), que culminam com uma cascata de reações, ativação da caspase apical, seguida de sinalização e clivagem proteica até a morte celular (64,66,79,80).

Mitsiades e cols. (2000) avaliaram a expressão de FasL e TRAIL em 31 espécimes de carcinoma tireoidiano. Verificaram expressão positiva em 10 de 12 casos para TRAIL, associado à ativação da caspase-10. Não houve correlação com dados clínicos (diâmetro, metástase, extensão ou recorrência) (78). Ahmad e cols. (2000) verificaram que as caspase-1, -6, -8 e -9 foram as principais vias de indução de apoptose pelo TRAIL; sendo que a inibição dessas vias por anticorpos anti-

caspases ocasionou inibição da morte celular TRAIL-induzida. As caspase-2 e -3 não mostraram participação efetiva na atividade apoptótica mediada por TRAIL (81). Essas observações demonstram o papel importante do TRAIL na indução de morte celular em neoplasias do epitélio folicular tireoidiano, com preservação dos tireócitos normais, sendo seu conhecimento de relevância para perspectivas terapêuticas na abordagem do CDT avançado, segundo os autores.

De acordo com Cvejic e cols. (82), existe um importante desequilíbrio entre a inibição de apoptose / morte celular (Bcl-2 e Bax) com a proliferação celular em células foliculares da tireoide. Ao comparar marcadores apoptóticos entre 39 casos de micro-CPT e 46 CPT clássicos, os autores verificaram menor atividade apoptótica no grupo de PTC vs. micro-CPT. No entanto, chamam a atenção pela presença de Bcl-2 positivo em praticamente todos os casos de micro-CPT, o que demonstra certo potencial de malignidade, devendo esses casos serem tratados com cautela (82).

Mezosi e cols. (83) estudaram tireócitos derivados de bócio nodular, *in vitro*, e concluíram que são resistentes a apoptose induzida por FasL ou TRAIL, o que pode ser relevante em relação à regulação aberrante do crescimento de nódulos de tireoide. Adicionalmente, a sensibilidade à morte celular induzida por TRAIL se correlacionou inversamente ao tamanho do bócio e sendo assim é provável que o sistema TRAIL seja importante na manutenção da normalidade das populações de células tireoidianas e a resistência ao TRAIL contribuiria para o desenvolvimento do bócio nodular.

A literatura mostra-se vasta quanto ao estudo dos mecanismos de apoptose e proliferação celular em relação ao CDT e tecido normal adjacente e autoimune; no entanto, mostra-se escassa quanto ao impacto desses marcadores por expressão IHQ em nódulos benignos da tireoide e sua correlação com aspectos clínicos e ultrassonográficos, potencialmente aplicáveis na prática médica diária. El May e cols. (84) estudaram os marcadores de apoptose em 10 pacientes com nódulo tireoidiano e o impacto do uso de terapia com RIT (> 6 meses) em cinco desses casos portadores de BMN. Após 6 meses da ablação com RIT, observou-se um aumento de dez vezes no número de tireócitos apoptóticos, associado à redução de detecção de CD34 para metade das células, desaparecimento de reatividade do Bcl-2 e imuno-reatividade Bax presente em apenas um caso de célula folicular e endotelial. O excesso de iodo proporcionou aumento de atividade de apoptose em células endoteliais e foliculares (84).

ANGIOGÊNESE – VEGF E SEUS RECEPTORES

A angiogênese é um processo crucial na fisiologia (homeostase) e, ao mesmo tempo, no crescimento tumoral, sendo definida como o aparecimento de novo sistema vascular independente dos vasos pré-existentes (29,30,85). Esse mecanismo fisiológico é facilmente percebido durante a fase embrionária e o ciclo menstrual, desenvolvimento mamário na lactação, resposta imune, inflamação e cicatrização, além de apresentar importante papel no aparecimento, desenvolvimento e agravamento de situações como doenças autoimunes, retinopatia diabética e, sobretudo, neoplasias (85-87). No adulto saudável, a proliferação vascular é baixa e a angiogênese raramente ocorre (86).

Folkman (86) propôs que tumores sólidos são dependentes do processo de angiogênese para pequenos aumentos de diâmetro, e estimulam maior fluxo sanguíneo local. A medida da angiogênese através da densidade micro-vascular (MVD) apresenta relação com pior prognóstico, aparecimento de metástases e redução de sobrevida, em diversos tipos de tumores, como mama e estômago. O mecanismo de angiogênese é estudado especialmente em tumores malignos, sendo que lesões pré-malignas também apresentam aumento de expressão de fatores de crescimento vascular em relação a tecidos não tumorais adjacentes (29,86,87).

Estudos com inibidores da angiogênese, como angiostatina e endostatina, promoveram redução tumoral quando administradas em estágios precoces, o que sugere o relevante papel da angiogênese na progressão tumoral (87). O início do processo de angiogênese é marcado pela ativação por um sinal estimulatório (como um fator específico de crescimento), que leva à ativação de proteases nas células endoteliais (fator ativador do plasminogênio), seguida da degradação da matriz extracelular ao redor dos vasos, acompanhada da migração e proliferação endotelial (85-87). As células endoteliais então se reorganizam em uma estrutura tubular (“brotos vasculares”), seguida da fusão de novos vasos formados e, ocasionalmente, por anastomoses; com base no balanço entre fatores pró- *versus* fatores inibidores da angiogênese. O fluxo vascular presente nos vasos recém-formados serve de estímulo para a interação entre as células endoteliais e a matriz celular, bem como a

migração e diferenciação de pericitos e células da musculatura lisa, que determinam a estabilidade futura dos novos vasos (86,87).

O balanço entre os fatores estimuladores e inibidores da proliferação vascular é o mecanismo principal responsável pela maior ou menor formação de novos vasos no organismo. O aumento da demanda por oxigênio (O_2) serve de estímulo para a formação de novos vasos nos tecidos em crescimento, através da ativação dos fatores induzidos por hipóxia (HIF). Esses fatores estimulam a expressão de vários genes relacionados à angiogênese, como os genes da família dos fatores de crescimento endotelial / VEGF (88).

Os principais indutores do crescimento e proliferação vascular descritos são o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento do fibroblasto tipo 2 (FGF-2). O processo de inibição da angiogênese é ainda pouco compreendido, sendo alguns fatores descritos na literatura, como a angiostatina, um produto da clivagem do plasminogênio e, a endostatina, resultante do metabolismo do colágeno XVIII (86-88). A trombospondina-1 é outro fator anti-angiogênico descrito, regulado pela ação do gene p53, tendo sua expressão reduzida em processos tumorais avançados (nos quais há perda da função do gene p53) (86).

Ao promover a estabilidade dos novos vasos, bem como inibir a proliferação vascular, os fatores anti-angiogênicos determinam a resolução do processo de angiogênese, sendo esse balanço fundamental no mecanismo de proliferação da vasculatura em tecidos benignos e malignos em nosso organismo. Segundo Folkman (86), a aquisição do “fenótipo angiogênico” nas células tumorais é consequência do desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogênicos, possibilitando a formação e desenvolvimento de novos vasos, tornando maior a viabilidade das células tumorais, e a expansão e crescimento tumoral.

Os fatores pró-angiogênicos envolvem principalmente os marcadores VEGF e FGF-2, além da proliferina, fatores derivados do crescimento de plaquetas (PDGF), IL-8 e fator de crescimento do hepatócito (HGF), sendo que diversos estudos demonstram a importância do VEGF em processos fisiológicos e tumorais (85,88). FGFs foram os primeiros fatores de crescimento vascular descritos na literatura, sendo de maior relevância na presença de tumores avançados, na degradação da matriz celular, atuando através da alta afinidade com os receptores de superfície FGF tirosina-kinase (FGF-1 a 4) (89); já tendo sido descritos cerca de 20 tipos diferentes de receptores FGF. Os receptores FGF-1 e FGF-2 são os mais

relacionados com a atividade pró-angiogênica. Estudos diversos em modelos de câncer sustentam a ideia de que os VEGFs são mais importantes que os FGFs e outras famílias de fatores angiogênicos para o mecanismo de proliferação vascular e tumoral (86-89).

O VEGF, proteína de 34-45 kDa, atua na regulação da transcrição gênica hipóxia-dependente, uma família de genes que codificam proteínas relacionadas à proliferação e diferenciação de células endoteliais de vasos sanguíneos e linfáticos, incluindo diversas isoformas (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D), de diferentes origens cromossômicas. O gene de codificação do VEGF humano está organizado por 8 éxons, separados por 7 íntrons, localizado no cromossomo 6p21.3 (90). O *splicing* alternativo resulta na geração de 4 principais isoformas do gene VEGF-A: VEGF 121, 165, 189 e 206 (88,90). O VEGF-A¹⁶⁵, a principal isoforma em células humanas (VEGF-A), é uma glicoproteína homodimérica de 45 kDa que sofre dimerização e se liga à heparina, através de sítios específicos, receptores de VEGF (VEGFR-1 e 2). Após ser secretada, uma fração significativa permanece vinculada à superfície celular e matriz extracelular (86,88,90). O VEGF-B possui duas isoformas, B¹⁶⁷ e B¹⁸⁶, cujas funções ainda são pouco compreendidas; já as formas VEGF-C e VEGF-D apresentam papel importante na linfoangiogênese embrionária e do adulto (90,91).

A regulação da atividade e expressão do VEGF envolve diversos mecanismos, sobretudo a hipóxia, fatores de crescimento e citocinas e, sua ativação, é mediada por 3 receptores tirosina-quinase, principais: VEGFR-1 (Flt-1, *fms-like tyrosine kinase 1*), VEGFR-2 e VEGFR-3. Esses receptores apresentam 7 domínios Ig homólogos extracelulares, sendo o 2º e 3º domínios essenciais para ligação proteica e do 4º ao 7º domínio, essenciais para a dimerização do receptor (86,90,91). VEGFR-1 é expresso principalmente em leitos vasculares específicos, enquanto o VEGFR-2 pode ser encontrado em diversas células endoteliais, sendo o principal mediador da ação angiogênica do VEGF-A. A expressão do VEGFR-3 é limitada às células endoteliais de vasos linfáticos, em adultos, sendo observada uma maior expressão de seus ligantes (VEGF-C e VEGF-D) em metástases de linfonodos (90,91). Garcia e cols. (2010) verificaram maior expressão de VEGF-C, pela análise da densidade vascular linfática (LVD) em 110 espécimes de tireoide operadas, na área peri-tumoral em relação à tireoide normal. Os autores sugerem

tratamentos cirúrgicos mais agressivos na presença de maior expressão do VEGF-C em áreas adjacentes ao tumor maligno (91).

Estudos com IHQ demonstram expressão de VEGF não só nas células tumorais, como também na vasculatura dos tumores, evidenciando que o VEGF é secretado como um mediador parácrino que leva à ativação das células endoteliais (89,90). Expressões elevadas de VEGF estão associadas a pior prognóstico em câncer de mama e pulmão, sendo importante alvo terapêutico em uma série de processos de quimioterapia (86,89). A correlação entre a expressão de VEGF e seus receptores em nódulos tireoidianos ainda é assunto controverso na literatura. Estudos evidenciam baixa expressão desse receptor em tireoide normal e AF, ao contrário de espécimes de CPT (92,93). Huang e cols. mostraram maior expressão do receptor de VEGF-A em AF vs. CDT (94); em contrapartida, Jebreel e cols. (95), não observaram diferença de expressão dos receptores VEGF-1 e 2 em tumores benignos e malignos de tireoide. Esses resultados foram corroborados por Itoh e cols. (2010), que estudaram a expressão IHQ de VEGF-A em 18 casos de CPT e 11, tecidos de AF. Os resultados demonstraram forte expressão de VEGF-A em 10/18 casos de CPT em comparação com 3/11 casos de AF e 2/4 dos bócios estudados, no entanto, sem diferença estatística (29).

Huang e cols. (2001) estudaram a expressão de VEGF-A¹⁶⁵ por IHQ em 60 casos de CPT em comparação com 13 AF. Os autores verificaram forte expressão de VEGF-A em 76/84 (90,4%) espécimes de CPT em comparação com 3/11 (27,2%) AF; sendo que a expressão de VEGF foi mais intensa nos casos de AF em comparação aos carcinomas foliculares. Não houve relação da expressão de VEGF com pior prognóstico, idade, diâmetro ou extensão extra-glandular no CPT (94).

A expressão de VEGF não pode ser considerada um marcador exclusivo de malignidade tireoidiana até o momento, uma vez que sua presença tem sido observada em lesões benignas, como doenças autoimunes (Graves e TH), bócio coloide e nodular (96). Os dados de Itoh e cols. (2010) confirmaram a ausência de expressão de VEGF em casos de carcinoma anaplásico, linfomas malignos e doença de Graves, além de fraca expressão desse marcador em pequenas áreas de AF e bócio, quando avaliados pela técnica do anticorpo CD34 (29).

Drogas inibidoras do VEGF e bloqueadoras de seus receptores são estudadas em diversas neoplasias (85-87), o que remete a importância da determinação da expressão de VEGF em diferentes tecidos de tireoide, dados ainda

não consensuais na literatura. Segundo Soh e cols. (97), o uso de drogas anti-VEGF em tumores tireoidianos proporcionou redução de crescimento tumoral em 90%, o que reforça a importância do tema para novas perspectivas terapêuticas em nosso meio.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do Estudo

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (parecer 844/2008), acessamos o banco de dados de 643 pacientes tireoidectomizados no Hospital de Clínicas (HC-UNICAMP) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de 2000 a 2012. Avaliamos aleatoriamente 350 pacientes, sendo incluídos 242 casos de doença nodular da tireoide, que continham dados clínicos, citológicos, ultrassonográficos (laudo radiológico e/ou imagens) e histopatológicos disponíveis (laudo/bloco de parafina) e suficientes para a análise; as etapas do estudo foram detalhadas no fluxograma abaixo (Figura 4).

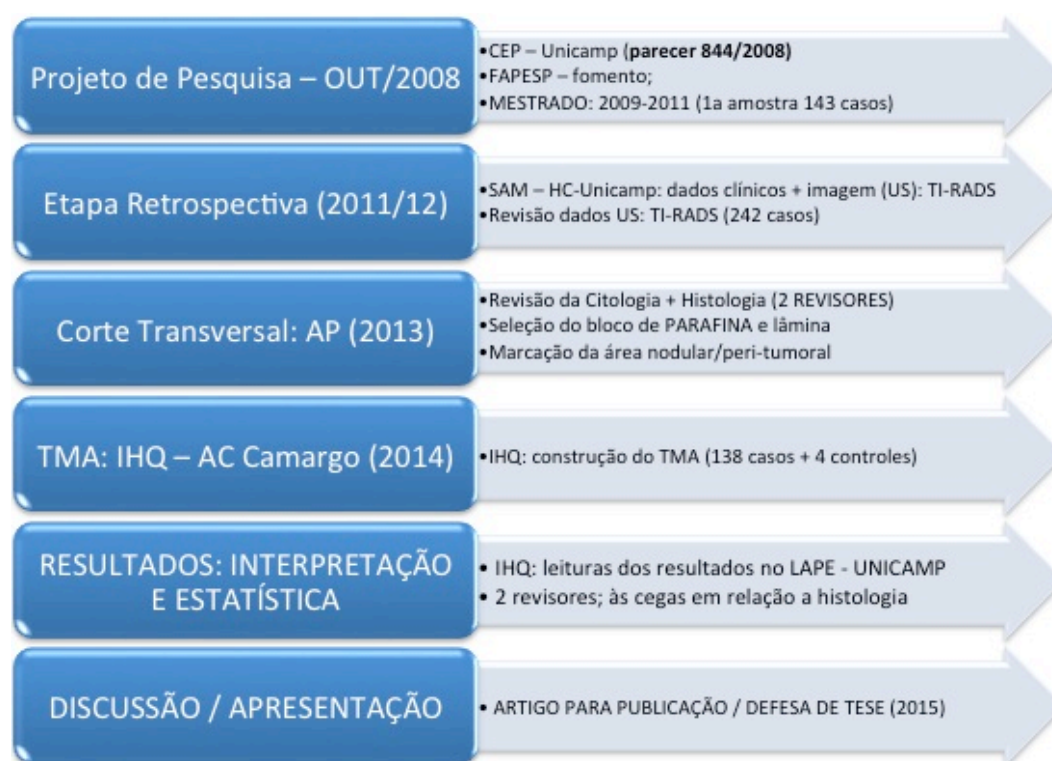


Figura 4 – Cronograma e etapas do estudo no período de 2011 a 2015.

Os achados histológicos confirmaram 111 (46,3%) nódulos malignos: 97 CPT (66 da forma clássica, CPTC; 31 da variante folicular, CPT-FV); 11, CFT e 3 casos de CMT. Os 131 casos benignos tratavam-se de 41 AFs e 90 casos de bócio adenomatoide. Dos 242 pacientes, foram incluídos 140 casos aptos ao estudo por IHC. Foram excluídos 2 casos por se tratar de CMT (área nodular), resultando em 138 lesões nodulares (neoplasias benignas e malignas) e 144 espécimes não tumorais (140 áreas adjacentes ao tumor: 33 tecidos de tireoidite, 107 áreas de tireoide normal e 4 casos controles), conforme demonstrado na Fig. 5.

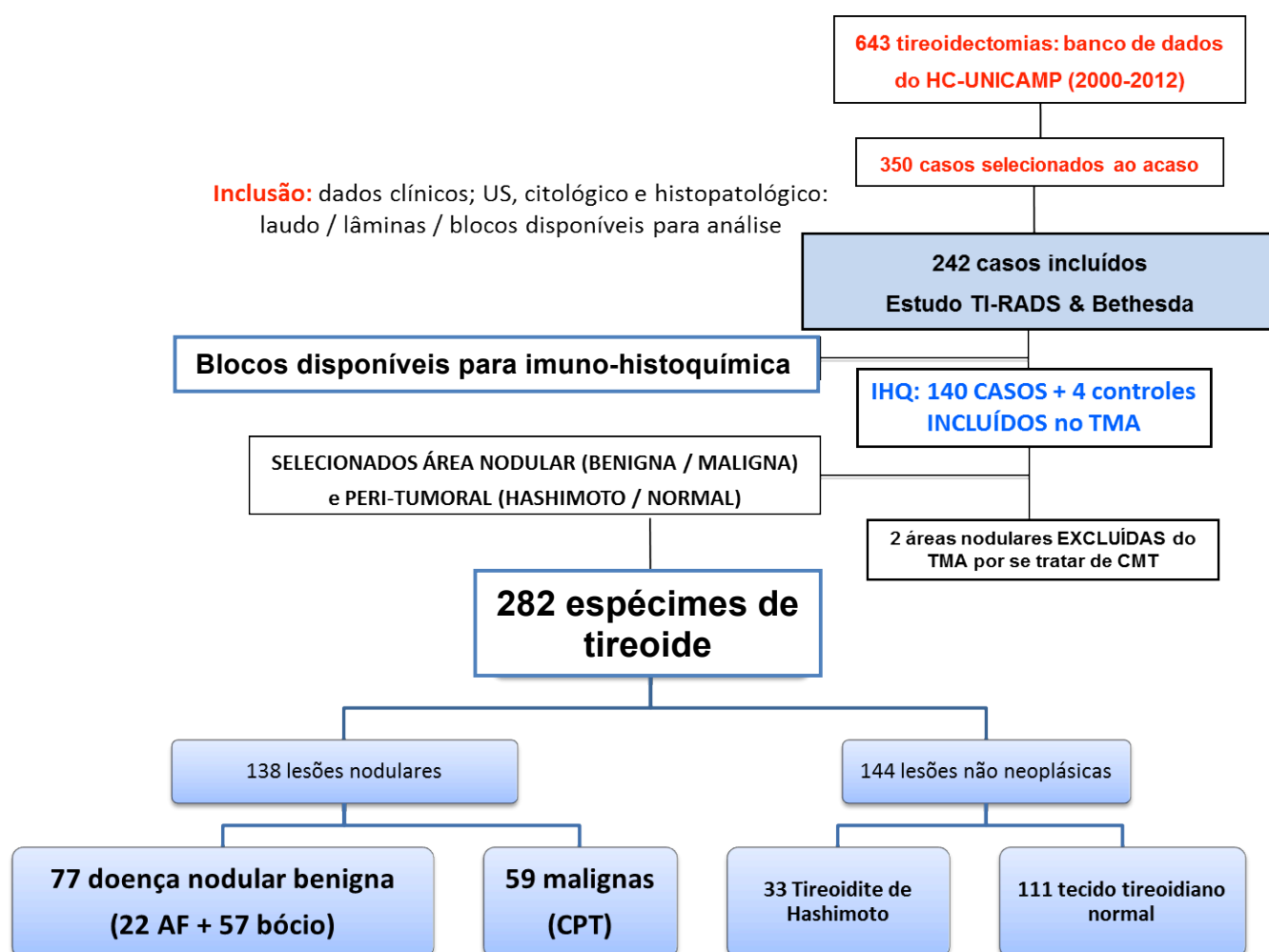


Figura 5 – Desenho do estudo: lesões neoplásicas e não tumorais submetidas à análise por imuno-histoquímica, FCM-UNICAMP, 2015. AF, adenoma folicular. CPT: carcinoma papilífero de tireoide. CMT: carcinoma medular de tireoide. TMA: banco de micro-tecidos.

Avaliação Clínica, Ultrassonográfica e Citológica

Foram coletados retrospectivamente os dados clínicos referentes a idade, sexo, níveis séricos de TSH e T4L, anticorpos anti-tireoperoxidase (anti-TPO) e anti-tireoglobulina (anti-Tg). Considerou-se o nódulo como não funcionante se a função tireoidiana era normal: TSH e T4L dentro dos valores de referência, sem evidência cintilográfica de nódulo hipercaptante no pré-operatório; e o nódulo foi considerado “tóxico” na presença de tireotoxicose clínica e/ou subclínica: TSH suprimido, com ou sem elevação de T4L e/ou triiodotironina livre (T3L), e cintilografia compatível com nódulos hipercaptantes. A positividade dos anticorpos anti-TPO e/ou anti-Tg definiu o diagnóstico de doença tireoidiana autoimune (DAT).

As concentrações séricas de TSH foram dosadas através do método de electroquimioluminescência (EIA) – técnica *sandwich*, utilizado em analisador de imunoensaio Elecsys TSH (Roche), sendo considerado intervalo de normalidade de 0,4 a 4,5 μ UI/mL. As concentrações de T4L foram dosadas através do método de EIA – princípio de competição utilizado em analisador de imunoensaio Elecsys FT4 (Roche), sendo considerado intervalo de normalidade de 0,9 a 1,8 ng/mL. Os anticorpos anti-TPO e anti-Tg foram dosados por EIA, princípio de competição utilizado em analisador de imunoensaio Elecsys Anti-TPO e anti-Tg (Roche), sendo considerados valores normais inferiores a 35 μ UI/mL e 115 μ UI/mL, respectivamente.

Ultrassonografia – Classificação TI-RADS

Os dados de US foram obtidos pela revisão de prontuário da época da cirurgia, com base no laudo e/ou imagens disponíveis, realizados no serviço de radiologia do HC-UNICAMP, obtidos em aparelho de US com frequência múltipla linear com transdutor de 10-12 MHz para análise morfológica e 4.5-7 MHz para análise de *Doppler*. Foram verificados os aspectos relacionados à morfologia da tireoide, como dimensões dos lobos, ecotextura do parênquima, descrição dos nódulos (tamanho

em três dimensões, formato, ecogenicidade, regularidade da borda, fluxo e calcificações). Todos os nódulos foram então classificados às cegas pelo mesmo autor (FFRM), através do escore TI-RADS em categorias de 2 a 5, conforme fluxograma (Figura 6 A/B) adaptado (13,16,17). Em função do longo período de observação na análise dos pacientes (2000-2012), verificamos que diferentes membros do serviço de radiologia do HC-UNICAMP realizaram os exames de imagem tireoidiana, não sendo possível controlar as variáveis inter-examinadores nesses casos.

A PAAF-US foi realizada em nódulos com diâmetro $\geq 1\text{cm}$ ou $< 1\text{cm}$ quando presentes características suspeitas à US: hipoeogenicidade, microcalcificações, irregularidade da borda, linfadenopatia isolateral e fluxo central (2,13,16,17). A PAAF-US foi realizada com agulha de calibre 22-G, sem anestesia local. Pelo menos três amostras foram obtidas para uma análise citológica adequada.

A vascularização do nódulo à US foi definida como de alta suspeita na presença de fluxo central maior/igual ao periférico, conforme a escala de 1-5: 1, ausência de fluxo; 2: fluxo periférico; 3, fluxo periférico $>$ central; 4, fluxo central $>$ periférico, e, 5, fluxo central (13). As categorias 3 a 5 foram agrupadas como de moderada a alta suspeita para malignidade, com base na literatura prévia (6,13,15,19).

Considerou-se, portanto, os resultados TI-RADS 4B e 5 como US de alta suspeita (positivo) e TI-RADS 3 e 4A como baixa suspeita (negativo), classificados conforme o escore adaptado (fluxograma) nas figuras 6A e 6B.

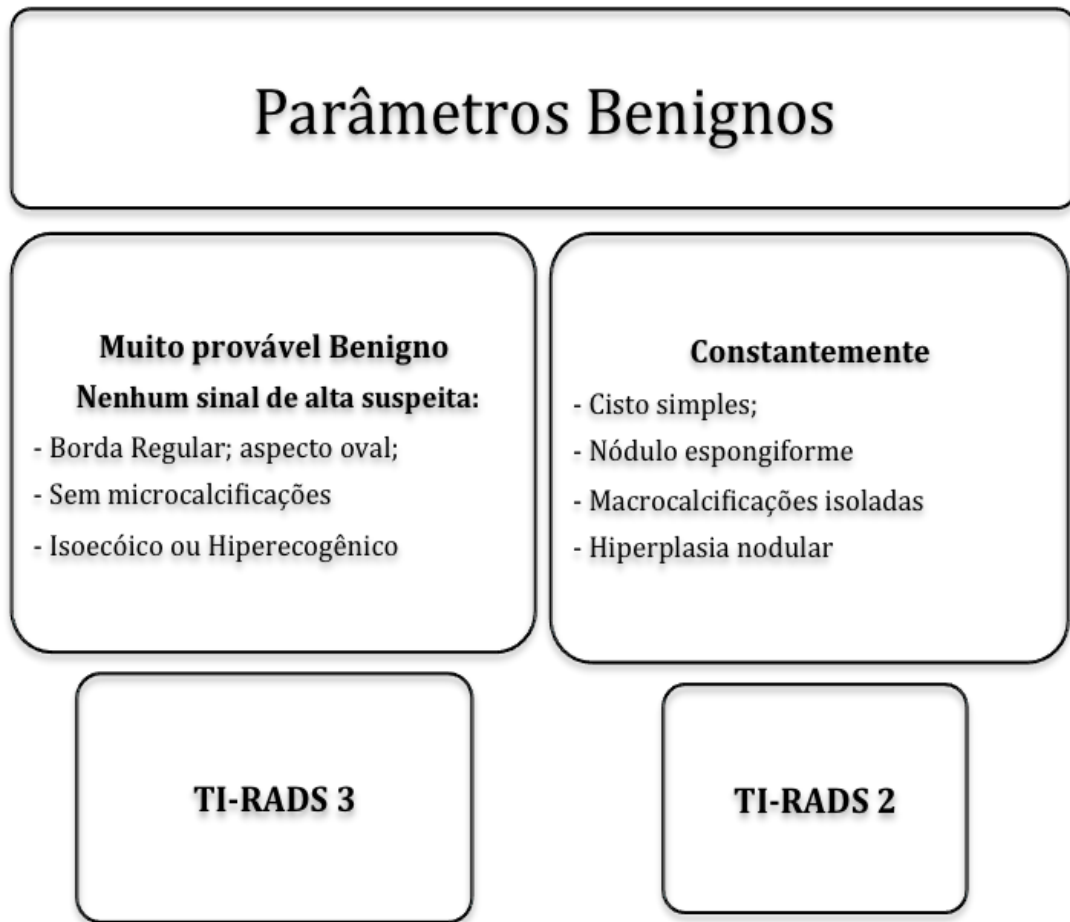


Figura 6A – Fluxograma adaptado de Russ e cols. (17) para caracterização dos nódulos tireoidianos pela ultrassonografia e classificação pelo sistema TI-RADS: parâmetros benignos.

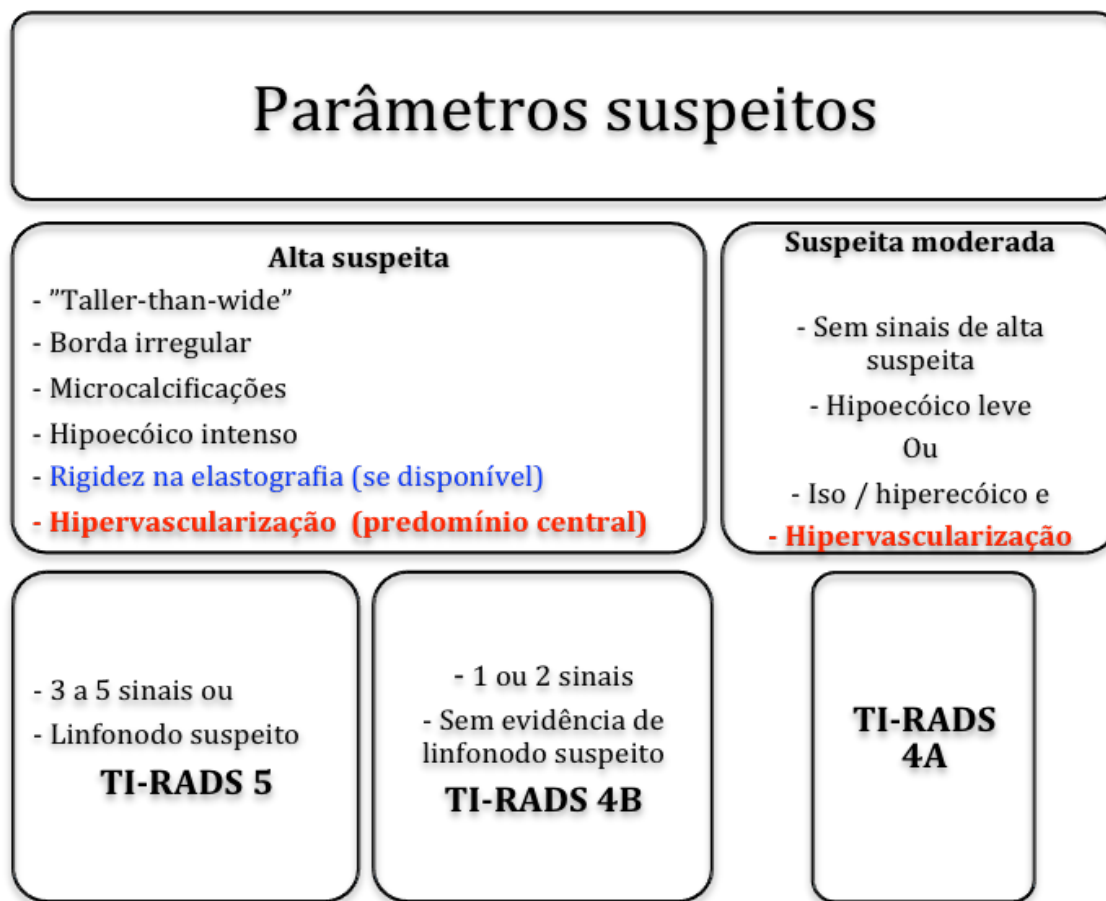


Figura 6B – Fluxograma adaptado (17) para caracterização dos nódulos tireoidianos pela ultrassonografia e classificação pelo sistema TI-RADS: parâmetros suspeitos para malignidade.

Citologia – PAAF – Classificação de Bethesda

Todas as lâminas e laudos de cito- e histologia foram revisados às cegas e classificados pelo sistema de Bethesda, em conjunto pelo autor (FFRM) e um patologista experiente na área, Profa. Dra. Patrícia Matos, para se confirmar o diagnóstico citológico, bem como histológico com base nos critérios da Organização Mundial de Saúde e *Livolsi's classification of thyroid pathology* (40,41). As amostras insatisfatórias não foram incluídas nos cálculos, sendo considerado o mínimo de 6 grupamentos de 10 células foliculares para amostra satisfatória (1,40,41,42). O resultado da PAAF-US foi então classificado pelo sistema atual de Bethesda em categorias de I a VI, a saber: I, insatisfatório; II, benigna; III, lesão folicular de

significado indeterminado; IV, neoplasia folicular; V, suspeito de malignidade e, VI, maligno (2).

O resultado benigno incluía nódulo coloide, hiperplasia adenomatosa, tireoidite linfocítica e doença de Graves. As categorias indeterminadas (III e IV) incluía lesão folicular, tumor de células de Hürtle e de células atípicas. A neoplasia folicular (Bethesda IV) demonstrou arquitetura folicular, núcleos sobrepostos, hiper-celularidade, escasso material coloide e sem alterações nucleares específicas do CPT. O resultado da PAAF-US foi considerado suspeito para malignidade quando demonstrado a presença de estruturas papilares ou arquitetura folicular com sobreposição e/ou alargamento nuclear, irregularidade do contorno; na presença de pseudo-inclusões e fendas, considerou-se como Bethesda VI compatível com malignidade. Os resultados para malignidade foram confirmados através de cirurgia e exame anatomopatológico.

Durante a revisão às cegas do diagnóstico final de histopatologia em relação ao diagnóstico original (laudo oficial do departamento de patologia do HC-UNICAMP), realizada por dois examinadores, concomitantemente, foram selecionados os blocos de parafina adequados para análise, procedida a marcação das áreas tumoral e peri-tumoral, que representava o bloco doador; e enviados para construção do *tissue microarray* (TMA), conforme Figura 7. Foram excluídos os blocos de parafina com amostra considerada insuficiente para corte histológico e construção do TMA.



Figura 7 – Etapas para construção das micromatrizes teciduais (TMA): revisão de lâmina e bloco de parafina para diagnóstico histológico no departamento de patologia da UNICAMP, com marcação das áreas tumoral e peri-tumoral; configurando o bloco doador; seguiu-se o envio desse material ao hospital AC Camargo para elaboração do TMA (“bloco receptor”), com posterior marcação pelos anticorpos específicos no Laboratório de Patologia Especial (LAPE) da UNICAMP (LAPE-CAISM).

Imuno-histoquímica - Técnica e Avaliação

Do total de 242 pacientes estudados, 138 casos e 4 controles foram submetidos à IHC. Estudamos a expressão de marcadores de angiogênese (VEGF), crescimento celular (p27, Ki-67) e apoptose (Fas, FasL, Bcl-2, Mcl-1) em 282 tecidos tireoidianos parafinados dispostos em um sistema de TMA (Tabela 1), a saber: 81 neoplasias (TFA: 22; CPT: 59) e 201 lesões não tumorais (Figura 5).

Os cortes histológicos então com suas respectivas áreas de interesse tumoral e peri-tumoral foram submetidos a cortes cilíndricos de 1mm de diâmetro e transportados para um chamado bloco receptor, com intervalos de 0,3mm entre os cilindros, realizado no serviço de imuno-histoquímica do hospital AC Camargo. Cada cilindro amostral era alocado em uma posição específica do bloco receptor conforme a definição prévia em um sistema cartesiano de coordenadas, cujo conjunto final constituiu um sistema TMA. Uma planilha em Excel foi previamente elaborada contemplando exatamente as mesmas posições dos casos no sistema TMA, para posterior registro dos resultados.

Para orientação no momento da leitura do TMA, na primeira linha horizontal e primeira posição da coluna 1, tanto na área tumoral quanto peri-tumoral, foram dispostos fragmentos de tecidos de placenta como tecido controle. As amostras foram descritas em duplicatas, a fim de se evitar e minimizar eventuais perdas inerentes ao método de TMA.

Os blocos de TMA foram então desparafinados e reidratados em gradiente crescente de álcoois. A recuperação antigênica foi realizada em 10 mM de tampão citrato, pH 6, na panela de pressão por 10min., até a temperatura ambiente. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com 0.3% de H₂O₂ e dos sítios de ligação inespecífica com BSA 3%. O tecido foi incubado por uma noite, a 4°C, seguindo-se a marcação com os anticorpos específicos para apoptose, controle do ciclo celular e angiogênese, e respectivas diluições, para o estudo por IHC (Tabela 1).

Tabela 1. Anticorpos marcadores de apoptose, angiogênese e controle do ciclo celular, empregados no estudo imuno-histoquímico de lesões tireoidianas benignas e malignas.

Marcador IHC	Clone / Diluição		Fabricante
	Anticorpo	Diluição	
Bcl-2	Monoclonal, M 088701-2	1:150	Dako, USA
Mcl-1	Rabbit monoclonal, code Ab-32087	1: 50	Abcam, Cambridge, MA, USA
FasL	Ab-1 Rabbit polyclonal, cod. Ab-2440	1: 70	Abcam, Cambridge, MA, USA
Fas	Rabbit polyclonal, code Ab-2437	1: 25	Abcam, Cambridge, MA, USA
Ki-67	Monoclonal, clone MIB-1, M724001-2	1:500	Dako, Carpinteria, CA, USA
p27	Monoclonal, M 720301-2	1: 50	Dako, USA
VEGF	Monoclonal, M 727329-8	1:100	Dako, Carpinteria, CA, USA

A reação foi visualizada pelo sistema streptavidina-biotina-imunoperoxidase (Dako) com diaminobenzidina como cromógeno. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina. As lâminas foram desidratadas, montadas com lamínulas e observadas em microscópio óptico. O controle negativo foi realizado com a substituição dos anticorpos por salina, conforme literatura prévia (34,35). O controle positivo foi: pâncreas para p27, linfonodos para Ki-67 e Bcl-2; amígdalas para Mcl-1, Fas, FasL e VEGF, conforme dados dos fabricantes.

Imuno-histoquímica – Interpretação dos Resultados

As análises foram realizadas em microscópio óptico binocular por dois observadores, às cegas, sendo um patologista especialista em IHC, Prof. José Vassallo, e o autor (FFRM); em momentos distintos e individualmente. Os casos discordantes foram revistos em conjunto até um consenso entre os examinadores. Quando uma mesma amostra apresentou diferentes valores de marcação entre suas duplicatas, foi considerado como definitivo o resultado com maior valor.

O padrão de positividade foi baseado no cálculo de imuno-reatividade percentual em no mínimo 500 células. Para cada uma das lâminas de cada marcador foi realizada uma avaliação visual e semi-quantitativa, analisando-se a intensidade de coloração e percentual de células foliculares positivas, em aumento de 200x.

A expressão nuclear foi verificada para os marcadores Ki-67 e p27; a expressão citoplasmática, para Bcl-2 e VEGF; e para Fas/FasL, foi considerada a expressão em membrana / citoplasma. Diferentes *pontos de corte* foram atribuídos a cada marcador, conforme a literatura prévia; sendo considerado como forte expressão para Bcl-2 quando um mínimo de 30% das células estavam claramente positivas e, 50% para Fas/FasL.

A expressão da proteína Mcl-1 foi classificada em: 0%, negativo; 1+ (1-19%); 2+ (>20%); sendo fortemente positiva (2+) na presença de coloração castanha intensa no epitélio folicular; e levemente positiva (1+) na coloração amarelo-

castanho. Considerou-se negativa a coloração apenas do colóide sem positividade em epitélio/citoplasma.

Para p27, considerou-se a escala de 4 pontos: 0%, negativo; 1+ (1-10%); 2+ (11-25%); 3+ (26-50%) e 4+, acima de 50%, conforme a literatura (30,31,34); sendo agrupados os resultados 3+ e 4+ como forte vs. fraca positividade (0%, 1+ e 2+), para efeito estatístico. Para expressão de Ki-67, considerou-se: 0%, negativo; fraco (<1%); positivo (1-2%) e fortemente positivo (>2%), sendo agrupados os resultados positivos (>1%) como forte expressão, para os cálculos estatísticos, em acordo com Viacava e cols (56).

RESULTADOS

Dados clínicos, TI-RADS & Bethesda

A revisão histopatológica identificou 111 nódulos malignos e 131 benignos. A indicação cirúrgica baseou-se na citologia suspeita/maligna ou em nódulos com citologia Bethesda II e sinais / sintomas compressivos (59 casos). A frequência de malignidade conforme a citologia foi descrita na tabela 2. Nódulos benignos foram significativamente maiores que os malignos (mediana 2,5cm vs. 1,8cm, $P=0,002$).

Tabela 2 – Resultados da citologia conforme a classificação de Bethesda e correlação histológica final em 242 nódulos tireoidianos operados no HC-UNICAMP, de 2000 a 2012.

Bethesda	Benigno	Maligno	Malignidade (%)
I	5 (3,8%)	9 (8,1%)	-
II	42 (32,1%)	17 (15,3%)	-
III	52 (39,7%)	5 (4,5%)	8,7%
IV	19 (14,5%)	20 (18,1%)	51,3%
V	13 (9,9%)	27 (24,3%)	67,5%
VI	-	33 (29,7%)	-
Total	131 (100%)	111 (100%)	-

Sensibilidade 83,3%; Acurácia 55,7%; Valor preditivo negativo 71,2%

Excetuando-se a idade e parâmetros da US, não verificamos diferença significativa entre os nódulos benignos e malignos quanto as variáveis clínico-laboratoriais estudadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros clínico-laboratoriais de 242 pacientes portadores de nódulos de tireoide classificados de acordo com a histologia.

Variáveis	Benignos	Malignos	Total	P-value
Nódulos (n)	131	111	242	-
Idade (anos) [mediana]	49	43	46,5	0,001
Sexo Feminino (n,%)	113/131 (86,3%)	95/111 (85,5%)	208/242 (85,9%)	0,88
Nódulo solitário (n,%)	89/126 (70,6%)	67/109 (61,5%)	156/235 (66,4%)	0,13
Diâmetro > 2cm (n, %)	85/124 (68,5%)	51/111 (45,9%)	136/235 (57,8%)	NS
TSH (mU/mL) [mediana]	1,86	1,10	1,1	1,15
DAT* (%)	26%	27,9%	26,9%	0,77
TI-RADS 4B e 5 (n, %)	23/117 (19,6%)	52/102 (50,9%)	75/219 (34,2%)	0,001

*Nota: DAT: doença tireoidiana autoimune.

Com base na histologia, a acurácia do escore TI-RADS foi de 66,7%, com alta especificidade (80%) e VPP (70%). Observamos uma alta correlação entre o escore TI-RADS 4B/5 e presença de malignidade; evidente em metade dos nódulos malignos em relação a 20% dos tumores benignos ($P<0,001$). O diagnóstico do nódulo de tireoide pela US de escore TI-RADS 5 resultou em alta especificidade (95%) e VPP (78%), independente do resultado citológico. A taxa de malignidade nos nódulos foi estimada conforme o escore TI-RADS (Tabela 4).

Tabela 4 – Risco de malignidade pelo escore TI-RADS (*Thyroid Imaging Reporting and Data System*) em nódulos tireoidianos operados conforme histologia (benignos vs. malignos) no HC-UNICAMP, 2000-2012.

TI-RADS	Nº casos	Taxa de Malignidade (%)	Benigno	Maligno
	(n)	(%)	(n / %)	(n / %)
3	57	29,8%	40 (34,1%)	17 (16,6%)
4A	87	37,9%	54 (46,1%)	33 (32,3%)
4B	48	64,5%	17 (14,6%)	31 (30,4%)
5	27	77,7%	6 (5,2%)	21 (20,7%)
Total	219	46,5%	117 (100%)	102 (100%)

A avaliação combinada TI-RADS / Bethesda mostrou que 80% dos nódulos com citologia Bethesda III apresentavam US escore TI-RADS 3 ou 4A (baixa suspeita), o que resultou em um alto VPN (90%). Já os nódulos TI-RADS 4B/5 com citologia Bethesda IV e V apresentaram alto risco de malignidade (75% e 76,9%, respectivamente; $P<0,001$), conforme demonstra a tabela 5.

Verificamos vascularização aumentada em 39,8% dos nódulos pela US, sendo que o fluxo central predominante foi detectado em mais da metade dos casos malignos (57,8%) contra 24,2% dos nódulos benignos ($P=0,01$). Cerca de 42% dos nódulos malignos apresentaram fluxo periférico predominante.

Tabela 5 – Risco de malignidade em 127 nódulos indeterminados e suspeitos de tireoide pela avaliação combinada TI-RADS e Bethesda, operados no HC-UNICAMP.

TI-RADS*	Total	Bethesda III		Bethesda IV		Bethesda V	
	(n)	N	Malignidade (%)	N	Malignidade (%)	N	Malignidade (%)
3	37	21	2 (9,5%)	8	3 (37,5%)	8	5 (62,5%)
4A	50	23	2 (8,7%)	11	4 (36,4%)	16	11 (68,9%)
4B	26	10	1 (10%)	10	7 (70%)	6	4 (66,7%)
5	14	1	-	6	5 (83,3%)	7	6 (85,7%)
Total	127	55	5 (9,1%)	35	19 (54,2%)	37	26 (70,2%)

*TI-RADS: thyroid imaging reporting and data system. $P < 0,001$

Imuno-histoquímica

Dados clínicos – citológicos – imagem do subgrupo de 138 casos submetidos à imuno-histoquímica

Do total de 242 pacientes operados por nódulos de tireoide, 138 casos e 4 controles (tireoidectomia por outro motivo) foram submetidos ao estudo por IHC; sendo 59 casos malignos (42,8%) e 79, benignos (57,2%). Foram excluídos os casos malignos de CFT e CMT, devido à amostra pouco representativa; sendo os casos malignos, portanto, referentes exclusivamente às amostras de CPT quanto aos resultados por IHQ.

Não houve diferença significativa entre os grupos benigno e maligno quanto às diversas variáveis clínico-laboratoriais estudadas, sobretudo quanto aos níveis de

TSH, diâmetro, presença de TH ou nódulo frio. Nessa análise de subgrupo (138 casos), manteve-se a alta correlação entre os escores TI-RADS 4B/5 e risco de malignidade; evidente em 43% dos nódulos malignos versus 25% dos tumores benignos ($P<0,05$). A citologia indeterminada foi verificada em 77 casos submetidos à IHC (55,8%), a saber: 43, Bethesda III; 14, Bethesda IV e 20, Bethesda V. Verificamos 86,4% dos tumores em estágio I e II e, 13,6%, em estágio III e IV. O resultado de estadiamento mais comum foi T1-2,N0,M0.

Expressão imuno-histoquímica dos marcadores de apoptose, angiogênese, e controle do ciclo celular em lesões benignas e malignas de tireoide

A expressão dos marcadores de apoptose, angiogênese e controle do ciclo celular (supressão do crescimento, p27; estímulo da proliferação, Ki-67) foi representada na Tabela 6.

Tabela 6 – Frequência comparativa de alta expressão dos marcadores de apoptose, angiogênese e controle do ciclo celular em 282 lesões benignas e malignas de tireoide.

	Maligno	Benigno		Área Peri-tumoral		Total	P-value
	CPT	AF	Bócio	TH	NOR		
	(n) / (%)	(n) / (%)	(n) / (%)	(n) / (%)	(n) / (%)	(n) / (%)	
Bcl-2	45/58 (77,6%)	18/21 (85,7%)	49/55 (89,1%)	25/32 (78,1%)	88/109 (80,7%)	114/136 (83,2%)	0,24
Mcl-1	38/57 (66,7%)	8/21 (36,3%)	16/54 (29,1%)	9/32 (28,1%)	29/109 (26,6%)	100/134 (74,6%)	0,003
Fas	53/57 (92,2%)	20/21 (95,2%)	51/56 (91,1%)	23/32 (71,8%)	91/109 (83,5%)	125/138 (90,6%)	0,62
FasL	44/57 (77,1%)	17/21 (80,9%)	42/55 (76,3%)	20/32 (62,5%)	72/110 (65,4%)	105/136 (77,2%)	0,88
Ki-67	15/59 (34%)	4/21 (19%)	4/56 (7,1%)	6/32 (18,8%)	11/110 (10%)	40/138 (28,9%)	0,031
p27 (1+, 2+)*	10/59 (17,1%)	5/21 (23,8%)	13/56 (23,2%)	7/32 (21,9%)	39/109 (35,9%)	110/138 (79,8%)	0,65
VEGF	40/56 (71,4%)	18/21 (85,7%)	44/56 (78,5%)	17/32 (53,1%)	62/110 (56,4%)	104/135 (77,1%)	0,38

Notas: AF: adenoma folicular de tireoide; TH: tireoidite de Hashimoto; CPT: carcinoma papilífero de tireoide; NOR: tecido tireoidiano normal. *Nota: p27 ponto de corte: expressão em menos de 50% das células.

Mcl-1: perfil de expressão em carcinomas de tireoide (CPT), lesões nodulares benignas e tireoide normal

O perfil IHQ de forte expressão (2+) da proteína Mcl-1 nas diferentes lesões nodulares benignas e malignas demonstrou acurácia de 68% na discriminação de malignidade, conforme demonstrado na Figura 8.

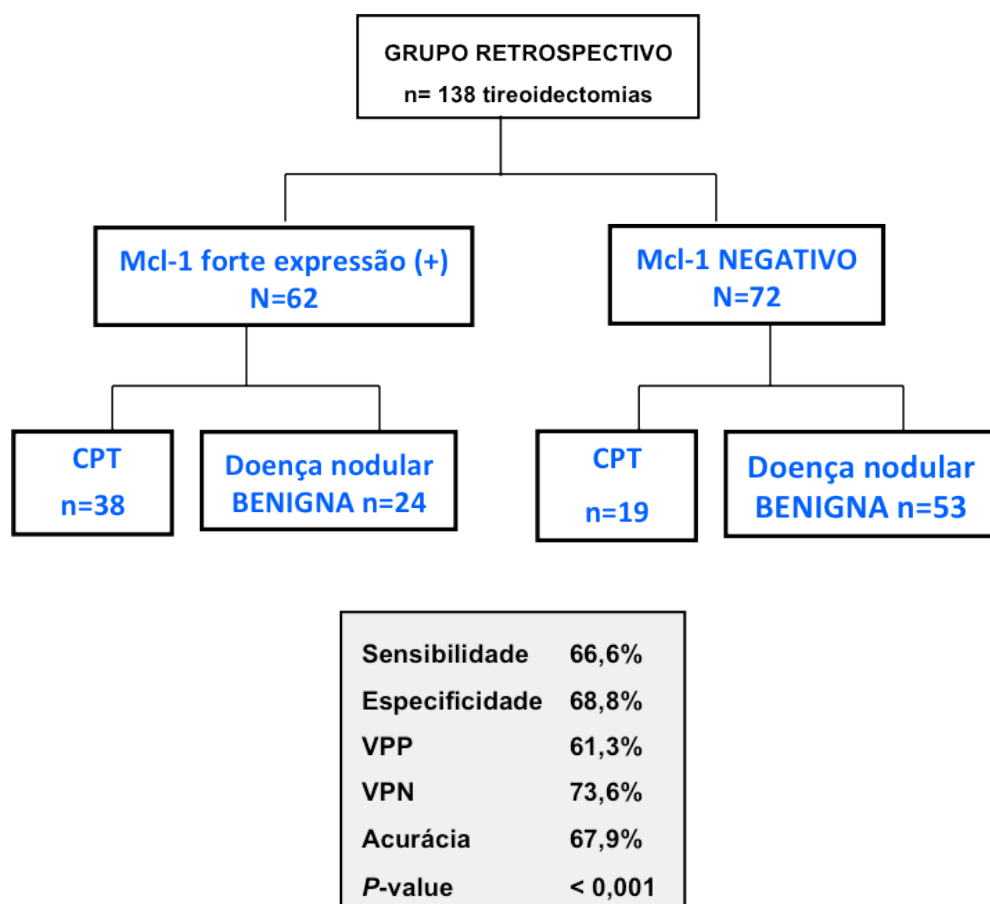


Figura 8 – Representação esquemática da forte expressão de Mcl-1 em nódulos de tireoide operados. CPT: carcinoma papilífero de tireoide; VPP: valor preditivo positivo; e VPN, valor preditivo negativo.

Quanto à presença de qualquer expressão da proteína Mcl-1 (positividade citoplasmática graus 1+ e 2+) em lesões tireoidianas, observou-se alta acurácia na distinção entre CPT (91,2%) e lesões nodulares benignas (30,4%, $P=0,003$), com alta sensibilidade (91,2%); especificidade (68%); VPN (91%); VPP (68,4%), resultando em uma acurácia de 78% (Fig. 9).

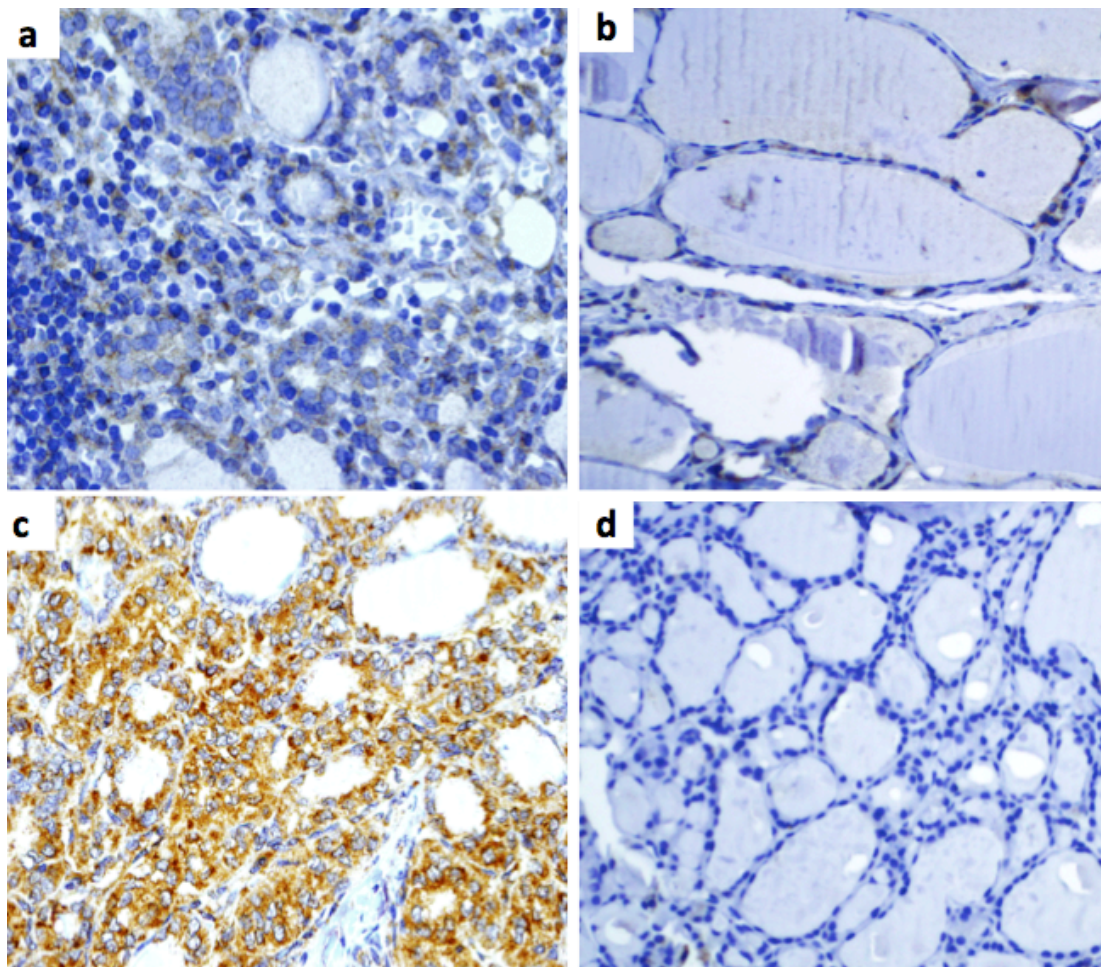


Figura 9 – Expressão e distribuição das proteínas Ki-67 e Mcl-1 em lesões malignas e benignas de tireoide: Forte expressão dos marcadores Ki-67 (a) e Mcl-1 (c) em tecido maligno (carcinoma papilífero) de tireoide; Baixa ou ausente expressão de Ki-67 (b) e Mcl-1 (d) em bócio e tireoide normal (x200), respectivamente.

A expressão de Mcl-1 foi significativamente superior tanto em amostras de CPTC e CPT-FV em relação à doença nodular benigna: bócio ($P<0,001$) e AF ($P<0,05$); bem como tecido linfocitário (áreas de TH, $P<0,01$). Não houve diferença na expressão

de Mcl-1 em tecidos benignos (TH e tecido tireoidiano normal). Não houve diferença na expressão de Mcl-1 entre os subtipos de CPT (forma clássica ou variante folicular).

Mcl-1: expressão IHQ concomitante aos demais marcadores de apoptose, angiogênese e crescimento celular

A expressão de Mcl-1 associada ao marcador Ki-67 é demonstrada na Figura 10. O marcador Ki-67 foi mais frequente nos espécimes malignos (CPT, 34%), com predomínio em CPT de histologia clássica (CPTC 63,6%), quando comparados à expressão de Ki-67 em neoplasias benignas (AF, 19%; $P=0,031$) e bócio (7,1%), o que resultou em alta especificidade (85,7%), VPP (65,2%) e moderada acurácia de 57,8%. O perfil de forte expressão Mcl-1(+)/Ki-67(+) foi verificado em 57,5% dos casos malignos (CPT), o que significou um aumento de especificidade (71%) e VPP (75,8%), nesses casos.

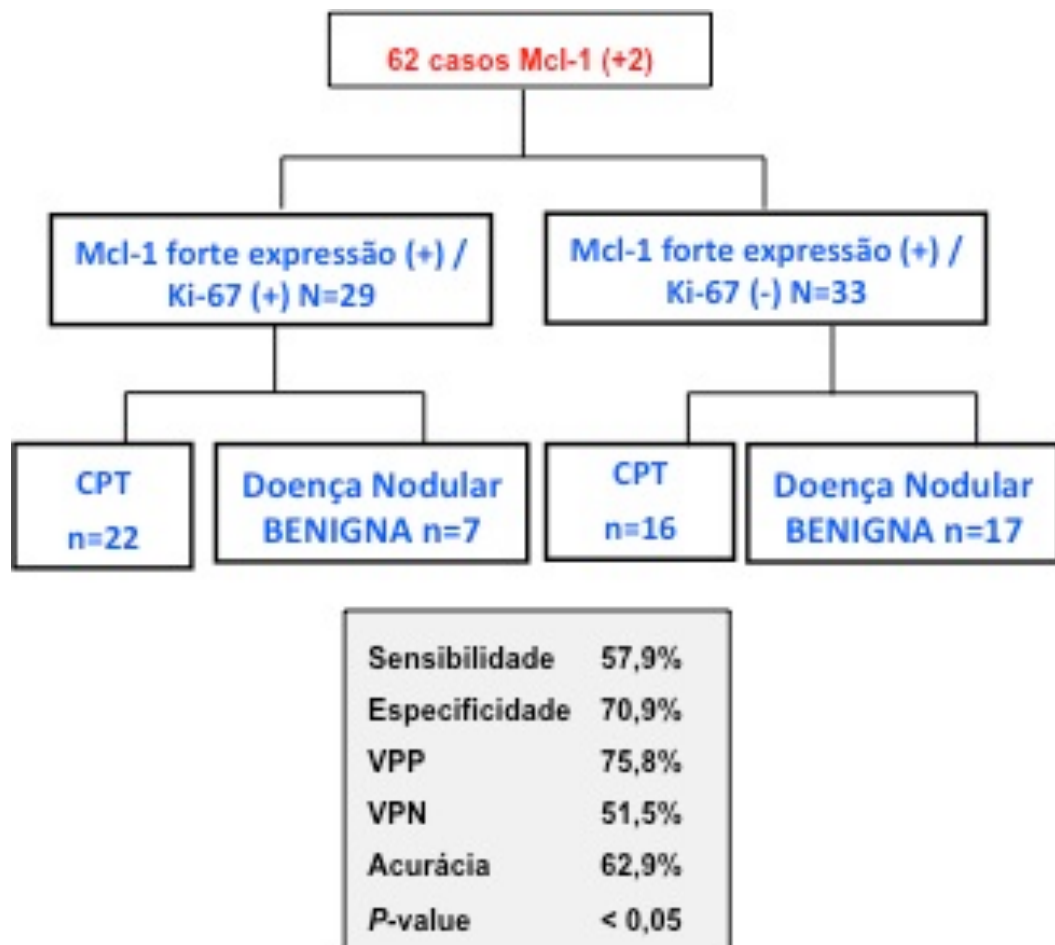


Figura 10 – Representação esquemática da expressão dos marcadores Mcl-1 em associação com Ki-67 em nódulos de tireoide operados. PTC: carcinoma papilífero de tireoide; VPP: valor preditivo positivo; e VPN, valor preditivo negativo.

Os demais marcadores (VEGF, p27, Fas/FasL, Bcl-2) não mostraram diferença estatística na caracterização de nódulos benignos e malignos (Tabela 6, Fig. 11). A forte expressão de Fas e FasL foi evidenciada em lesões benignas tumorais (AF) e bócio em relação às áreas de TH e tecido normal.

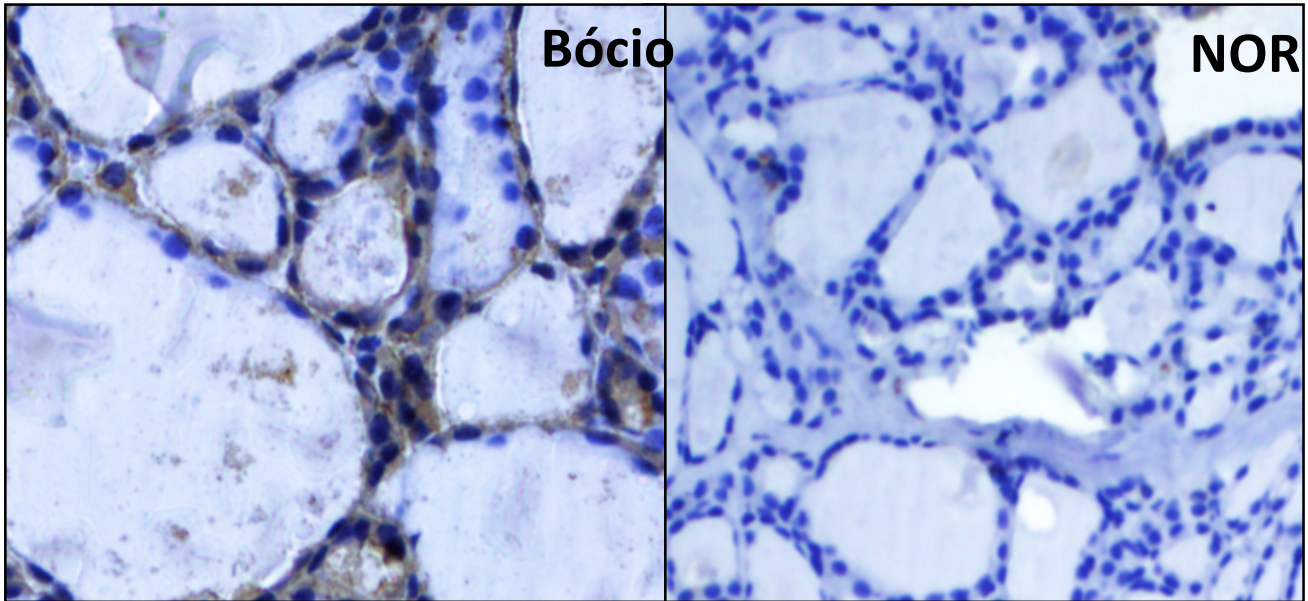


Figura 11 - Forte expressão citoplasmática de VEGF-A em lesão benigna (bócio) em relação a fraca/ausente expressão de VEGF em tecido tireoidiano normal (NOR) (x200).

Correlações entre a expressão IHC dos marcadores de apoptose, angiogênese e proliferação celular e as variáveis clínicas, de imagem e citologia de nódulos benignos e malignos estudados

Dos 77 nódulos indeterminados, 29 (37,7%) confirmaram malignidade. A expressão de Mcl-1 foi positiva em 92,6% (22/28) desses casos, sendo 100% dos casos Bethesda III, 85,7% e 92,9% dos casos Bethesda IV e V, respectivamente. Cerca de metade dos casos de citologia indeterminada identificou forte expressão de Mcl-1, o que resultou em uma acurácia de 61% para discriminar neoplasias benignas e malignas (Fig. 12).

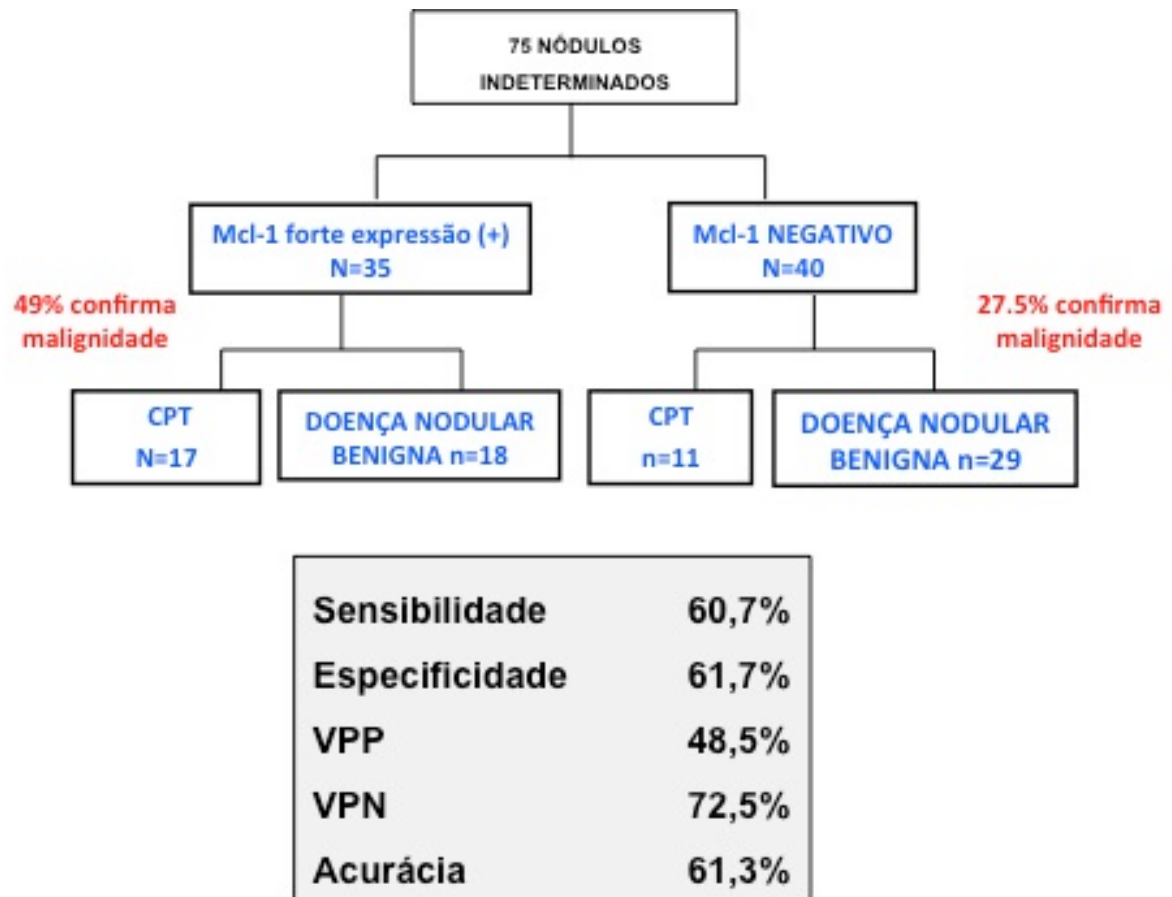


Figura 12 – Expressão imuno-histoquímica da proteína anti-apoptótica Mcl-1 em nódulos de tireoide operados com citologia prévia indeterminada.

O perfil de expressão Mcl-1(+)/Ki-67(+) diferenciou lesões indeterminadas em benignas ou malignas com acurácia de 59,2% e VPN de 68,4%. Não houve correlação entre a expressão de Mcl-1, Bcl-2, Fas, FasL, p27 e VEGF com as demais variáveis clínicas e de imagem nesse estudo (Tabela 7). A forte expressão de Ki-67 foi associada à presença de anticorpos anti-Tg (previamente à cirurgia) em nódulos malignos (CPT) ($P=0,03$).

Tabela 7 - Correlação da expressão da proteína Mcl-1 com parâmetros clínico-patológicos em diferentes lesões tireoidianas benignas e malignas.

Variáveis	Mcl-1		Total	Valor de <i>P</i>
	POSITIVO	NEGATIVO		
	62	72	134	
Diagnóstico histológico maligno (n,%)*	40 (62,5%)	19 (26,3%)	59 (43,4%)	0,003
Idade > 45 anos	35 (57,3%)	47 (65,2%)	82 (61,6%)	NS
Sexo feminino (%)	55 (85,9%)	60 (83,3%)	115 (84,5%)	NS
Nódulo solitário (%)	38 (60,3%)	44 (62,9%)	82 (61,7%)	NS
Diâmetro > 2cm	32 (51,6%)	47 (70,1%)	79 (54,2%)	NS
TSH > 1.8 mU/ml	24 (50%)	20 (41,6%)	44 (45,8%)	NS
Ultrassonografia de alta suspeita	46 (77,9%)	43 (65,2%)	89 (71,2%)	NS
Estadio TNM III / IV	7/38 (18,4%)	2/19 (10,5%)	9/57 (15,8%)	NS

Não significativo (NS) para $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

Com a finalidade de se conhecer os mecanismos envolvidos na tumorigênese tireoidiana de lesões benignas e malignas, estudamos um painel de proteínas relacionadas a apoptose (indutoras: Fas, FasL; bloqueadoras: Mcl-1, Bcl-2); angiogênese (VEGF-A) e controle do ciclo celular (Ki-67, p27) em um sistema TMA constituído por espécimes de tireoide normal, bócio adenomatoso, adenomas, tireoidite de Hashimoto e CPT. Além disso, buscamos estudar o impacto de diversas variáveis clínicas e laboratoriais na associação entre as categorias citológicas baseadas no sistema de Bethesda e o escore ultrassonográfico TI-RADS para a predição de malignidade em nódulos de tireoide.

Esse estudo evidenciou frequência significativa de forte expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1 no material de histologia em espécimes malignas de tireoide (CPT) em comparação com lesões nodulares benignas (AF e bócio), tecido com infiltrado inflamatório (TH) e tireoide normal; sendo que a expressão simultânea Mcl-1(+)/Ki-67(+) aumentou a especificidade e VPP para malignidade nesses casos. Os demais marcadores de apoptose (Fas/FasL, Bcl-2), angiogênese (VEGF) e controle do ciclo celular (p27) não apresentaram correlação significativa com a expressão de Mcl-1 nos diferentes tecidos de tireoide avaliados. Não se verificou associação entre a expressão IHC da proteína Mcl-1 com variáveis preditivas de malignidade, sejam clínico-patológicas ou de imagem (US) na doença nodular tireoidiana.

A avaliação do escore TI-RADS nesse estudo comprovou a acurácia do método em nódulos tireoidianos com citologia indeterminada. Assim, nódulos com citologia Bethesda III e US de baixa suspeita (TI-RADS 3/4A) apresentaram alto VPN, com baixa taxa de malignidade; o que sugere a tomada de uma conduta mais conservadora; em contrapartida, consideramos que a indicação cirúrgica pode ser amplamente sugerida para nódulos Bethesda IV e V, corroborando estudos anteriores, e que apresentem US escores TI-RADS 4B/5, em face do alto risco de malignidade (> 75%) evidenciado nesse estudo. Reforçamos ainda que Cibas e cols. (2) na publicação original referente à citologia de Bethesda não definiram as categorias de citologias indeterminadas; sendo assim, consideramos os extremos de

resultados de citologias Bethesda II e VI como as referências (benigno e maligno, respectivamente), sendo os resultados intermediários Bethesda III, IV e V definidos como indeterminados, em acordo com demais autores (7-9), uma vez que embora a conduta cirúrgica esteja bem estabelecida para nódulos com citologia Bethesda V, o risco de malignidade é variável de 60 a 75%, o que pode resultar em até 40% de nódulos benignos (2).

A busca de modelos preditores de malignidade envolvendo características clínicas, laboratoriais como concentração de TSH, presença de Ac-TPO e Ac-Tg, e de imagem avaliada pela US cervical, é uma aspiração de longa data na busca de se estabelecer condutas cirúrgicas mais bem definidas e seguras em casos suspeitos para malignidade. Em nossa casuística de 242 pacientes, verificamos que a idade foi significativamente menor em pacientes com nódulos malignos em relação aos tumores benignos da tireoide, compatível com a história natural da doença que afeta principalmente uma população mais jovem em relação ao carcinoma folicular (3,5,10). Uma possível explicação para esse fato seria o diagnóstico mais precoce e a facilidade de acesso aos métodos de imagem, como o uso da US de tireoide como rotina de investigação diagnóstica por diversas especialidades médicas, proporcionando a detecção de tumores menores e o aparecimento frequente de microcarcinomas em pacientes mais jovens.

Em relação à importância dos níveis séricos de TSH para predição de malignidade na avaliação do nódulo tireoidiano, estudos prévios demonstraram que a concentração sanguínea elevada de TSH pode se associar a maior risco de CDT (10,12,98), dados não observados nesse estudo. Não verificamos diferença significativa quanto ao ponto de corte de TSH em 1.8mU/mL, tampouco em relação à presença de anticorpos relacionados à autoimunidade tireoidiana e/ou presença de TH. Boelaert e cols. (98) estudaram 1500 pacientes sem disfunção hormonal prévia e observaram alta probabilidade para CDT (OR: 2.72) em indivíduos com TSH entre 1.0–1.7 mU/L, em comparação com pacientes com TSH menor do que 0.4 um/L. Os autores verificaram maior incidência de CDT na presença de níveis de TSH entre 1.8–5.5mU/L (OR 3.88). Homens jovens apresentaram o maior risco de malignidade. No entanto, para um grupo específico de pacientes com nódulos de citologia indeterminada, tais resultados descritos por Boelaert e cols. (98) não foram corroborados por Gerschpacher e cols. (99). Os autores compararam as

concentrações séricas de TSH em 33 casos de micro-CPT submetidos à tireoidectomia total com um grupo controle de 54 casos de CPT acima de 1 cm. Não houve diferença significativa nos níveis séricos de TSH entre os grupos estudados, em consonância com os resultados obtidos em nossos 138 casos submetidos à IHQ. Não observamos diferença entre as concentrações séricas de TSH entre lesões benignas e malignas, tampouco correlação entre níveis hormonais e expressão de marcadores de apoptose ou proliferação celular. No entanto, McLeod e cols. (12) em metanálise que incluiu 40.929 indivíduos de um grupo controle em comparação a 5.605 casos de CDT, verificaram associação positiva entre TSH acima de 3mU/L e câncer, que resultou em OR de 1.87 para malignidade, dados não verificados em nossa casuística.

Frequentemente a associação de DAT, especialmente TH, e nódulos de tireoide é alvo de estudos na tentativa de se estabelecer relação entre a presença de TH e malignidade. As diretrizes indicadas pela *American Thyroid Association* sugerem provável associação de malignidade em nódulos presentes nas glândulas envolvidas com TH (1). No presente estudo, a análise de DAT definida por marcadores séricos não evidenciou tal correlação com malignidade em nódulos de tireoide, corroborando os achados prévios de nosso grupo (4,13) bem como os de Anil e cols. (100), que demonstraram taxa de malignidade de apenas 1% no grupo com doença autoimune da tireoide. Em nosso estudo, observamos ainda que as áreas de TH marcadas por IHQ não apresentaram expressão significativa de proteínas apoptóticas, de angiogênese ou de proliferação celular quando comparadas com tecido tireoidiano normal. No entanto, verificamos correlação significativa do marcador de proliferação celular Ki-67 com a presença do anticorpo Ac-Tg em espécimes de CPT, que pode sugerir uma tendência de maior descontrole do crescimento celular nesses casos. Lembramos que a expressão nuclear de Ki-67 foi considerada positiva em tireócitos, excluída a área de linfócitos nesse caso.

A US é o método de imagem mais utilizado na avaliação de nódulos tireoidianos que influencia diretamente na decisão de realizar ou não o estudo por PAAF-US; bem como a interpretação do risco de malignidade em nódulos indeterminados (1,5,6,10,17). O escore TI-RADS foi criado com o objetivo de melhor selecionar os nódulos candidatos à PAAF-US, evitando procedimentos desnecessários em nódulos de baixo risco e uniformizando a conduta em diferentes

centros (15-19). Os dois estudos iniciais foram considerados complexos devido ao número de parâmetros envolvidos, o que os tornava de baixa utilidade clínica (15,16), apesar da alta sensibilidade e VPN (88%) encontrados. Achados à US como hipoecogenicidade, microcalcificações, borda irregular, nódulos mais altos que largos (“taller than wide”) e hiperfluxo central ao *Doppler* são os critérios principais analisados pelos estudos envolvendo o escore TI-RADS nos diferentes centros (15-17). A recomendação dos autores (18,19) seria indicar PAAF-US para nódulos com escore TI-RADS 4 ou 5, sendo utilizado o ponto de corte de diâmetro de 0,7cm nos estudos do grupo francês (18,19). Os dados de Russ e cols. (19) evidenciaram malignidade em 25,7% e 44,1% dos 236 nódulos operados classificados como TI-RADS 3 e 4A, respectivamente, compatíveis com os dados encontrados em nosso estudo (29% e 38%).

Verificamos ainda alto VPN em nódulos de baixa suspeita à US (TI-RADS 3/4A) na presença de citologia Bethesda III, sendo que a associação com citologia Bethesda IV e V evidenciou um risco cerca de 1,5 a 2 vezes maior nesses casos. Por sua vez, nódulos de alta suspeita à US (TI-RADS 4B/5) e citologia Bethesda IV ou V apresentaram as maiores taxas de malignidade, sugerindo a tomada de conduta cirúrgica. Não foram encontrados estudos prévios na literatura que relacionaram os critérios TI-RADS e citológico de Bethesda em nódulos com citologia indeterminada, o que reforça a importância dos achados desse estudo. Um único estudo prévio (101) correlacionou os achados do escore TI-RADS com a citologia de Bethesda considerando nódulos com citologia inicial benigna (Bethesda II); os autores avaliaram 1398 nódulos de tireoide pela US, sendo 154 casos operados com citologia prévia benigna. O risco de malignidade foi acima de 10% para nódulos com escore TI-RADS 4c (3 ou 4 critérios) e, em torno de 20% para malignidade em nódulos com citologia Bethesda II e escore TI-RADS 5 (5 critérios) quando comparados com nódulos de escore TI-RADS 3, 4a e 4b. Os autores concluíram que nódulos com citologia Bethesda II e escore TI-RADS 4c ou 5 pela US deveriam ser submetidos a nova PAAF no seguimento pelo maior risco de malignidade nesses casos.

Os achados de baixo risco de malignidade em nódulos de tireoide com citologia Bethesda III e escore TI-RADS 3 e 4A embasam a conduta de se repetir a PAAF-US, bem como de se realizar a avaliação de marcadores moleculares no

material de citologia, possibilitando discriminar com maior precisão os casos com indicação cirúrgica. Gweon e cols. (102) acompanharam 155 nódulos com citologia Bethesda III, sendo que de 86 casos submetidos a nova PAAF-US, 51 (59,3%) apresentaram uma nova citologia Bethesda II, indicando conduta conservadora nesses casos. O seguimento por 12 meses mostrou evolução desfavorável em um caso (1,9%). Em consonância com esses dados, em análise de 541 pacientes operados por nódulos Bethesda III, 96 foram submetidos à segunda PAAF-US antes da cirurgia, que confirmou nódulo benigno (Bethesda II) em 41 (42,7%) casos (103). Nesse sentido, esses dois grandes estudos envolvendo nódulos operados com citologia Bethesda III e seguidos por PAAF-US demonstraram que cerca de metade dos nódulos nessa condição apresentaram um novo resultado citológico benigno (Bethesda II), favorável à conduta conservadora e corroborado por nossos achados de alto VPN em nódulos de baixa suspeita à US. Dentre todos os nossos casos operados que apresentavam citologia Bethesda III, cerca de 40% foram acompanhados enquanto que 60% tiveram indicação cirúrgica imediata. Nos pacientes seguidos com nova citologia e controle anual pela US cervical, a indicação cirúrgica ocorreu em média de 21 meses (1,5 a 2 anos) de intervalo entre a primeira e terceira punções (PAAF). Não houve diferença quanto ao risco de malignidade entre o grupo operado imediatamente e o grupo acompanhado por US cervical e PAAF.

Nesse contexto, a inclusão da análise de marcadores moleculares na citologia tornou-se cada vez mais frequente e necessária na busca de se aumentar a acurácia diagnóstica e melhor selecionar candidatos à cirurgia. O conhecimento do perfil de marcadores moleculares relacionados à tumorigênese tireoidiana é de extrema valia para se aperfeiçoar esse diagnóstico e estabelecer condutas direcionadas (3,8,9,11,46). O mecanismo neoplásico parece estar associado a um desequilíbrio entre o estímulo e/ou perda do bloqueio do crescimento celular e modificações nos mecanismos de apoptose (morte celular programada) bem como de vascularização tumoral (angiogênese) (21,85).

Nos casos de CPT, destacam-se as translocações e inversões que levam aos rearranjos moleculares do gene RET (*rearranged during transfection*), além das mutações ativadoras e translocações que envolvem os genes BRAF e RAS. Nikiforov e cols. (2014) avaliaram prospectivamente 143 pacientes com citologia

indeterminada (Bethesda III, IV e V) submetidos à tireoidectomia total; que realizaram estudo molecular pelo painel *ThyroSeq v2 next generation* (NGS), que avalia mutações em 13 genes específicos. Nesse grupo de lesões indeterminadas, a presença de qualquer mutação no teste molecular resultou em alta sensibilidade (90%), especificidade (93%), VPP (83%) e alto VPN (96%), com acurácia final de 92% para discriminar tumores malignos e benignos (9).

Zhu e cols. (25) estudaram a expressão dos marcadores RET, CK19, Gal-3 e HBME-1 em 155 casos de CPT. A expressão de CK19 foi significativamente maior em casos de CPTVF em relação ao carcinoma folicular, em consonância com os achados de estudo brasileiro (23), resultado da tese de doutoramento da profa. Patrícia Matos (UNICAMP, 2005).

Relacionado ao processo de apoptose, o gene codificador do Mcl-1 consiste em uma proteína de 37-kDa que exerce atividade anti-apoptótica na célula (39,43,68). Estima-se que a ligação de proteínas de domínio BH3 (Bim, Bid, Bak, Noxa e Puma) com a proteína Mcl-1 promova a indução de sua atividade anti-apoptótica, em uma ação protetora contra o TRAIL, indutor apoptótico (63). Em estudo pioneiro, Krajewski e cols. (36) avaliaram diversos tecidos provenientes de autópsias, como mama, testículo, pâncreas, estômago, rins, pele, pulmão, coração, adrenais, músculo, incluindo tecido tireoidiano normal para expressão IHQ de Mcl-1 e Bcl-2. Particularmente, a expressão de Mcl-1 mostrou-se fraca ou ausente em tireoide normal. Não encontramos dados na literatura atual referentes à expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1 em tecidos tireoidianos não neoplásicos, como áreas de bócio ou infiltrado inflamatório (TH).

Observamos forte expressão da proteína Mcl-1 em cerca de um terço das lesões benignas, sem diferença entre os subtipos analisados, seja TH, tecido normal ou bócio. Por outro lado, a expressão de Mcl-1 auxiliou na diferenciação histológica entre lesões nodulares benignas e malignas com acurácia de 78% para qualquer expressão e 68% para forte expressão de Mcl-1; com resultados igualmente satisfatórios em lesões tireoidianas com citologia indeterminada obtida previamente à cirurgia, em que a acurácia foi de 61% nesses casos; dados até então pouco debatidos na literatura. Branet e cols. (104) avaliaram a expressão IHQ dos genes Bcl-2, Mcl-1, Bax e Bcl-X em 23 espécimes de CPT comparados com 12 lesões nodulares benignas (AF). A proteína Mcl-1 foi estudada por anticorpo policlonal

(diluição 1:800) por um patologista, seguido da revisão de um segundo examinador com conhecimento dos resultados prévios da histologia. O critério de forte expressão foi baseado na análise subjetiva do patologista, classificado em expressão ausente; (+) fraca; (++) positiva e, (+++) fortemente positiva. Os autores verificaram forte expressão da proteína Mcl-1 em 65,2% (15/23 casos) dos carcinomas (CPT) em relação a 58,3% (7/12) dos adenomas, sem diferença estatística significativa ($P > 0,05$). A pequena amostra utilizada, bem como diferenças técnicas envolvendo o tipo de anticorpo, diluição e critérios de interpretação provavelmente influenciaram nos resultados divergentes de nosso estudo. Ressaltamos que desde a publicação de Branet e cols. (104) em 1996, a forte expressão da proteína Mcl-1 tem sido constantemente relacionada a piora de prognóstico em diferentes tumores, como mama, ovários, região cervical e tumores gástricos (37,38,42,74), com dados ainda pouco explorados na doença tireoidiana desde então.

Reforçamos aqui que utilizamos anticorpo anti-Mcl-1 monoclonal para realizar a reação IHQ, o qual não estabelece reação cruzada com outros membros da família Bcl-2, elevando desse modo a especificidade dos resultados. Segundo dados do fabricante (105), o anticorpo anti-Mcl-1 utilizado permite a detecção da isoforma 1 (Mcl-1L), conforme verificado em estudos utilizando a técnica de *western blot* (WB), em que se demonstrou a presença da proteína longa de 37 kDa. Assim sendo, a detecção de forte expressão da isoforma 1 (Mcl-1L) nos permite definir a natureza da proteína como anti-apoptótica e fortalece os resultados e conclusões encontrados nesse estudo.

A definição de forte expressão da proteína Mcl-1 pela IHQ como marcador anti-apoptótico baseou-se em estudos prévios (37,74,105); não sendo encontrados estudos envolvendo a expressão de Mcl-1 avaliada por IHQ ou outros métodos como análise de mRNA ou WB, que determinassem o tipo de isoforma estudada (38,42,68,69). A atividade pró-apoptótica de Mcl-1S (isoforma 2) descrita em ovários de ratas chinesas e placenta humana (70) por Bae e cols., não foi considerada como fator de interferência na ação anti-apoptótica de Mcl-1 pela maioria dos estudos prévios envolvendo tumores avançados de mama, estômago, colón, câncer cervical, ovários e tireoide; corroborando a significância dos nossos resultados (37,38,42,74,104,106,107).

Estudo prévio com amostras teciduais de carcinoma anaplásico de tireoide demonstrou os efeitos do inibidor multi-quinase Sorafenib, sabidamente utilizado em casos de câncer avançado, por antagonizar proteínas de apoptose e angiogênese como VEGFR-2, RAF quinases, MEK, c-Kit, entre outros (71). A droga Sorafenib foi originalmente aprovada para o tratamento de carcinoma renal (2005) e de fígado (2007) pelo *Food and Drug Administration* (FDA), sendo estudado em mais de 200 protocolos de pesquisa, incluindo casos avançados de CDT refratários ao tratamento convencional com cirurgia e RIT. Estima-se que a ação da droga Sorafenib promova redução da atividade Mcl-1 por inibição da via MAPK e do eixo Jak2/Stat3/Mcl-1, aumentando a sensibilidade à ação de drogas agonistas TRAIL atuantes nos receptores DR4 e DR5, induzindo morte celular por via extrínseca (71). Portanto, a forte expressão de Mcl-1 tem sido considerada uma barreira importante à ação de drogas anticâncer em diversas linhagens tumorais, sendo que a inibição de Mcl-1 está relacionada à maior sensibilidade a ação do TRAIL, indutor de apoptose, inclusive em casos de carcinoma anaplásico de tireoide (71). O conhecimento sobre as proteínas relacionadas à carcinogênese tireoidiana mostra-se relevante para o aprimoramento do uso de drogas anti-neoplásicas em casos de CDT avançados refratários à iodoterapia.

Os mecanismos envolvidos no controle da expressão do gene Mcl-1 ainda são objeto de diversos estudos e considerados de alta complexidade. Estima-se que o mRNA Mcl-1 tenha sua expressão estimulada ou induzida por diversas interleucinas, vias da MAPK, JAK/STAT e ativação de fatores de crescimento do endotélio (EGFR) (39,68,69). Estima-se que o tempo médio de vida da proteína Mcl-1 seja de 2 a 4 horas até sua clivagem e degradação por uma complexa cascata de ativação de proteínas quinases. Outra via de controle da expressão do gene Mcl-1 se realiza através da ação de mRNA, como verificado previamente em relação as proteínas Bcl-2, pela ação inibitória de mir-15 e mir-16, induzindo a morte celular (apoptose) (68,69). Os microRNAs representam pequenas moléculas de RNA que regulam a expressão de diversos genes através da interação sequencia-específica com o RNA mensageiro. A expressão elevada de Mcl-1 em tecidos de colangiocarcinoma se associaram à baixa expressão de mRNA mir-29b, que evidenciou papel significativo na regulação da atividade proteica Mcl-1 (73). A degradação e estabilidade da proteína Mcl-1 parece se relacionar com as cascatas

de fosforilação das serinas Ser¹⁵⁵ e Ser¹⁵⁹ e principalmente pela Treonina 163 no domínio PEST; além da existência de ação inibitória da proteína GSK3, promovendo rápida degradação da proteína Mcl-1 (39,43.108).

A associação entre o marcador apoptótico Mcl-1 e Ki-67, de controle do ciclo celular, foi observada em 40 espécimes de câncer cervical associados a pior prognóstico (38). Esses dados foram semelhantes em pacientes com câncer gástrico, em que se verificou forte expressão de Mcl-1 em 44,5% dos casos (37); associada a estágios avançados da doença e menor sobrevida em longo prazo. Os autores utilizaram anticorpo anti-Mcl-1 policlonal, com critérios de análise definidos em expressão citoplasmática ausente (<5%), fraca (5%-50%) e intensa (>50%). Em nosso estudo, utilizamos o ponto de corte de 20% para definição de forte expressão, conforme análise prévia da adequação da diluição estabelecida pelo prof. José Vassallo. A diferença entre os pontos de corte para expressão forte e fraca certamente leva a resultados diversos em tumores de diferentes origens, o que dificulta a comparação direta entre os estudos.

O controle do ciclo celular seja por estimulação exacerbada como exercido pelas proteínas Ki-67, p53, p21 e ciclina D1 ou mediado por supressão deficiente, como visto com a ação de p27, constitui-se em etapa fundamental no processo de carcinogênese de diversos órgãos (26,54-60). Ki-67 é um marcador de proliferação celular descrito em lesões benignas e malignas de tireoide, amplamente estudado na literatura em diversos tipos de tumores (26,40). Verificamos nesse estudo um predomínio de proliferação celular evidenciado pela forte expressão de Ki-67 em lesões malignas (CPT) em relação a doença nodular benigna da tireóide (AF e bócio) (Figura 3); dados corroborados por Saiz e cols. (26) em 19 casos de CPT e 10 AF, com acurácia de 72,4%. Estima-se que a proteína Ki-67 seja eficaz na diferenciação entre lesões foliculares, especialmente nos casos de doença avançada e metastática de CFT em relação aos AF (40).

Nossos dados evidenciam ainda um aumento de especificidade e VPP quando utilizada a associação entre Ki-67 e Mcl-1 para a diferenciação histológica entre lesões benignas e malignas da tireoide. Outros autores não encontraram associação entre a expressão de Ki-67 e lesões malignas de maior agressividade ou prognóstico na tireoide. Mar e cols. (31), em população japonesa, estudaram a expressão de Ki-67 em 20 AF e 22 CFT minimamente invasivos; não sendo

observada diferença significativa entre os grupos. Khoo e cols. (34) compararam a expressão de Ki-67 em 22 espécimes de CPT com metástases vs. 33 controles (micro-CPT sem metástase). Os autores não verificaram diferença significativa na expressão de Ki-67 entre os grupos estudados. Apesar da ausência de consenso sobre o papel da expressão de Ki-67 em lesões tireoidianas, Kakudo e cols. (2015) propuseram sua utilização como marcador prognóstico de risco em carcinomas de tireoide; considerando casos de CDT invasivo maiores que 1cm e expressão de Ki-67 < 5% como de baixo risco; Ki-67 positivo de 5%-10%, como de risco moderado; e alto risco, quando Ki-67 estiver expresso entre 10%-30% (40). Utilizando esses mesmos critérios para expressão de Ki-67 em carcinomas de tireoide, Miyauchi e cols. (109) avaliaram o prognóstico de 390 casos de CPT operados no Japão, no período de 1998 a 2004, seguidos por 88 meses (média). Os autores verificaram remissão em 53% dos casos de CPT com baixa expressão IHQ de Ki-67 (<5%); sendo que 87% dos casos com doença bioquímica persistente (tireoglobulina positiva) apresentaram expressão de Ki-67 maior do que 10%. Idade acima de 60 anos e extensão extra-tireoidiana foram marcadores de pior prognóstico com redução de sobrevida na análise multivariada (109). Esses dados fortalecem os achados em nosso estudo, que poderá servir de base para novas pesquisas com o intuito de se avaliar o impacto do uso das proteínas Mcl-1 e Ki-67 como marcadores prognósticos em casos de CPT.

Em contrapartida, a proteína p27 atua na regulação da transição das fases G1 para S e sua baixa expressão está associada a perda do controle do ciclo celular, proporcionando crescimento celular desordenado, evidente em diversos tipos de tumores (34,35,47,48). Karlidag e cols. (35) compararam a expressão das proteínas p53 e p27 em 15 casos metastáticos de CPT com 13, sem metástase linfonodal. Os autores descreveram a proteína p27 como importante marcador para tumores avançados e indiferenciados, associados à maior progressão da doença. Não verificamos maior frequência de baixa expressão de p27 em lesões malignas (CPT) em relação à doença nodular benigna; no entanto, verificamos diferença significativa entre os casos de CPT e tireoide normal, em consonância com a literatura (34,35). A baixa expressão IHC da proteína p27 foi demonstrada também em associação com o marcador de malignidade Gal-3 e em casos de CPT com mutação BRAF (55). O perfil p27(+)/Gal-3(+) demonstrou alta sensibilidade na

diferenciação entre AF e CPT minimamente invasivos e extensamente invasores; enquanto que o perfil IHC p27(+)/BRAF(+) analisado em 88 casos de CPT confirmou a associação da baixa expressão de p27 com metástase loco-regional em micro-PTCs BRAF positivos (48).

Quanto aos demais marcadores de angiogênese (VEGF) e apoptose (Fas, FasL e Bcl-2), não observamos diferença significativa no diagnóstico histológico entre tumores benignos e malignos da tireoide. Nenhuma correlação IHQ com a expressão de Mcl-1, clínica ou de imagem foi encontrada com impacto clínico significativo na discriminação de tumores benignos e malignos. Verificamos forte expressão de VEGF na doença nodular benigna em relação ao tecido normal adjacente e áreas de tireoidite crônica (TH). A expressão forte e difusa de VEGF esteve presente em 71% dos casos de CPT, sem acurácia significativa para discriminar tumores benignos e malignos.

Araújo-Filho e cols. (30) estudaram a expressão de VEGF (policlonal, Santa Cruz, USA; diluição 1:200) em 30 casos de CPT com invasão local em comparação com 18 espécimes de CPT com invasão de cápsula e 28 tecidos de CPT sem invasão. Foram considerados como critérios de positividade a expressão de VEGF: 0 (negativo); < 10% (1), 11%-50% (2), > 50% (3, forte expressão). Os autores encontraram forte expressão de VEGF em 44 casos, resultando em 57,8% da amostra avaliada. Entretanto, não houve diferença significativa na expressão de VEGF entre os grupos de CPT com ou sem invasão de cápsula ou local.

Itoh e cols. (29) estudaram a expressão IHQ de VEGF-A¹⁶⁵ (Lab. Vision, diluição 1:250) em 18 casos de CPT e 11 AF. Os autores consideraram como critério de positividade a expressão de VEGF acima de 5%, sendo definida como forte expressão quando área de células maior que 30% encontrava-se com citoplasma claramente positivo. Os resultados demonstraram presença de forte expressão de VEGF-A em 10/18 (55,5%) casos de CPT em comparação a 3/11 casos de AF e 2/4 dos bócios, sem diferença estatisticamente significativa, em consonância com nossos resultados. Avaliamos uma extensa amostra de bócio (n=56) e AF (n=21) resultando em forte positividade para VEGF em 85% e 77% dos casos, respectivamente. Os demais estudos se basearam em amostras pequenas, o que dificulta a interpretação dos resultados (29,30,94) em lesões benignas, especialmente. Além disso, verificamos VEGF fortemente expresso em cerca de

71% de amostra de espécimes malignas (CPT), que envolveu a análise de 59 casos; enquanto outros autores encontraram menores taxas, 55,5% (29) para 18 casos analisados e 57,8% (30) em 44 casos de CPT. Essa diferença pode ser atribuída aos diferentes pontos de corte usados para se definir forte expressão; além do uso de diluições e marcadores de VEGF-A de diferentes empresas e características.

Huang e cols. (94) estudaram a expressão de VEGF-A¹⁶⁵ (Calbiochem, USA; diluição 1:40) por IHQ em 60 casos de CPT em comparação com 13 AF, sendo considerado forte expressão quando a positividade IHQ era maior do que 50% da amostra. Os autores verificaram forte expressão de VEGF-A (difusa e intensa) em 76/84 (90%) espécimes de CPT em comparação com 3/13 dos casos de AF. Ainda, a expressão de VEGF foi mais intensa nos casos de AF em comparação aos carcinomas foliculares e 77% dos casos de AF demonstraram expressão de VEGF moderada a intensa; resultados semelhantes aos obtidos em nosso estudo. Adicionalmente, os autores não encontraram relação entre a expressão de VEGF e pior prognóstico, idade, diâmetro ou extensão extra-glandular do câncer tireoidiano.

Quanto aos demais marcadores de pró- (Fas, FasL) e anti-apoptose (Bcl-2) avaliados nesse estudo, não verificamos diferença significativa quanto ao diagnóstico histológico entre doença nodular benigna e CPT. Bayraktaroglu e cols. (80), avaliando 59 casos evidenciaram maior expressão para FasL em áreas de carcinoma papilífero vs. tecido normal adjacente e, sobretudo, em maiores de 45 anos, nas variantes oncocíticas e de células altas, independentemente do diâmetro e invasão capsular ou vascular, avaliados em 59 casos. Xu e cols. (110) estudaram a expressão de Fas, FasL e Bcl-2 em trinta casos de CPT e 30 CFT; e confirmaram diferença significativa entre forte expressão dos marcadores apoptóticos em casos de CPT em relação aos CFT.

Algumas considerações merecem destaque e devem ser reforçadas ao final dessa tese. Primeiramente, as dificuldades de coleta de dados em prontuários devem ser consideradas, como a interpretação dos dados da US e dificuldade de controle de variabilidade inter e intraindividual em relação ao examinador (médico do serviço de radiologia do HC-Unicamp), principalmente, antes do período de 2000. Além disso, não foi possível determinar os tipos de equipamentos utilizados para US nesse período de 2000 a 2012 no HC-Unicamp. No entanto, incluímos apenas os nódulos de tireoide operados que tinham todos os dados de US envolvendo o escore

TI-RADS, realizando a reclassificação mais adequada possível, minimizando a interferência do examinador na ocasião do exame de US.

Um segundo ponto a se considerar, está na dificuldade de comparação direta entre os diferentes estudos em função da ausência de padronização dos métodos e critérios de interpretação dos resultados; utilizando-se anticorpos de diferentes empresas, diluições e técnicas específicas e, sobretudo com *pontos de corte* diferentes para se considerar forte ou fraca expressão, o que provavelmente interfere nos resultados apresentados pelos diversos autores, especialmente em relação a proteína Mcl-1 (104).

Em terceiro lugar, utilizamos a técnica IHQ como critério para se determinar a expressão dos diversos marcadores, especialmente, a proteína Mcl-1; em acordo com a metodologia utilizada por outros autores, em câncer de ovário, gástrico e tireoide (37,74,104); uma vez que estudos anteriores validaram a expressão de Mcl-1 por IHQ em relação às técnicas de mRNA ou WB em câncer de mama (42), câncer cervical (42) e intestinal (105), além da comprovação prévia do próprio fabricante (105).

Em quarto, o anticorpo anti-Mcl-1 utilizado permite detectar a isoforma 1 da proteína Mcl-1 (Mcl-1L), através da expressão positiva por WB da porção longa, 37 kDa, conforme dados do fabricante (105); o que reforça os achados encontrados em nosso estudo. Enfatizamos ainda que não encontramos na literatura estudo que discriminasse o uso da proteína Mcl-1 em isoformas (Mcl-1L ou Mcl-1S) (37,38,42,74,105,106); sendo que os resultados de forte expressão para Mcl-1, independente do ponto de corte utilizado, definiu a natureza da proteína como anti-apoptótica, corroborando as conclusões da presente tese.

Em quinto, os resultados da expressão da proteína Mcl-1 e associação com outros marcadores de angiogênese, apoptose e proliferação celular foram avaliados em casos de CPT, não sendo adequado extrapolar tais achados para carcinomas foliculares ou indiferenciados. Novos estudos nesse sentido são necessários para se determinar o comportamento da proteína Mcl-1 em casos de CFT e sua importância no diagnóstico diferencial de lesões foliculares; subtipos de CPT com histologia agressiva; bem como seu papel no prognóstico em casos de DTC avançado, incluindo crianças e adolescentes, dados ainda não conhecidos na literatura.

CONCLUSÕES

- ✓ Nódulos indeterminados Bethesda III com US de baixa suspeita (TI-RADS 3 / 4A) apresentaram alto VPN e baixa taxa de malignidade;
- ✓ Nódulos indeterminados Bethesda IV e V com US de alta suspeita (TI-RADS 4B e 5), apresentaram alto risco de malignidade (> 75%);
- ✓ Esse estudo evidenciou uma frequência significativamente maior de forte expressão histológica da proteína anti-apoptótica Mcl-1 em nódulos malignos de tireoide (CPT) em comparação com nódulos benignos e tecido tireoidiano normal;
- ✓ A forte expressão histológica de Mcl-1 por IHC diferenciou o diagnóstico entre lesões nodulares benignas e malignas (CPT), incluindo os nódulos com citologia indeterminada previamente à cirurgia;
- ✓ O perfil de expressão IHQ Mcl-1(+)/Ki-67(+) proporcionou maior especificidade e VPP na diferenciação histológica de carcinoma papilífero e doença nodular benigna da tireóide;
- ✓ Não verificamos correlação clínico-patológica, laboratorial ou de imagem significativa para prática clínica em relação a expressão do painel de marcadores de apoptose e proliferação celular avaliados em nódulos de tireoide nesse estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos vinte anos, a proteína bloqueadora apoptótica Mcl-1 foi pouco explorada em estudos envolvendo a glândula tireoide, embora tenha sido descrita como importante marcador de prognóstico e de menor sobrevida em casos de câncer gástrico, cervical, ovariano e mama. O reconhecimento da proteína Mcl-1 como marcador anti-apoptótico associado à carcinogênese tireoidiana, especialmente em casos de CPT, e seu comportamento em lesões benignas neoplásicas e não tumorais representa um dado significativo a partir dos resultados desse estudo, ainda pouco debatido na literatura. Consideramos que esses achados de forte expressão IHQ de Mcl-1 associados ao marcador Ki-67 na diferenciação histológica entre lesões malignas (CPT) e benignas de tireoide podem ser relevantes no auxílio diagnóstico histológico na rotina do patologista.

O entendimento do papel da proteína anti-apoptótica Mcl-1 em casos de CPT pode servir de base para o aprimoramento de técnicas diagnósticas através do estudo biomolecular em material de citologia (PAAF) em futuros estudos prospectivos, especialmente na avaliação de nódulos indeterminados Bethesda III e IV. A avaliação desse marcador em casos de carcinoma folicular bem como de critérios de prognóstico no seguimento de pacientes com CPT, como resposta terapêutica ao radioiodo, taxas de recorrência, metástases futuras locais e a distância; avaliação de resposta bioquímica e estrutural no seguimento do CDT, incluindo grupos especiais como histologias agressivas e crianças/adolescentes, devem ser avaliados em novos estudos.

REFERÊNCIAS

1. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloss RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2009;19(11): 1167-214.
2. Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda system for thyroid report cytopathology. *Thyroid*. 2009;19:1159-1165.
3. Maia FF, Zantut-Wittmann DE. Thyroid nodule management: clinical, ultrasound and cytopathological parameters for predicting malignancy. *Clinics* 2012;67(8):945–54.
4. Maia FF, Matos PS, Pavin EJ, Vassallo J, Zantut-Wittmann DE. Value of Ultrasound and Cytological Classification System to Predict The Malignancy of Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. *Endocr Pathol*. 2011;22(2):66-73.
5. Gharib, H, Papini E, Paschke R. Thyroid nodules: a review of current guidelines, practices, and Prospects. *Eur J Endocrinol*. 2008;159:493–505.
6. Gul K, Ersoy R, Dirikoc A, Korukluoglu B, Ersoy PE, Aydin R, et al. Ultrasonographic evaluation of thyroid nodules: comparison of ultrasonographic, cytological, and histopathological findings. *Endocrine*. 2009; 36(3):464-72.
7. Lee MJ, Hong SW, Chung WY, Kwak JY, Kim MJ, Kim EK. Cytological results of ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology for thyroid nodules: emphasis on correlation with sonographic findings. *Yonsei Med J*. 2011;52(5):838-44.
8. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med*. 2012; 367: 705-15.
9. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, et al. Highly Accurate Diagnosis of Cancer in Thyroid Nodules With Follicular Neoplasm/Suspicious for a Follicular Neoplasm Cytology by ThyroSeq v2 Next-Generation Sequencing Assay. *Cancer*. 2014; 120(23):3627-34.
10. Eng CY, Quraishi MS, Bradley PJ. Management of Thyroid nodules in adult patients. *Head & Neck Oncology*. 2010; 2 (11): 1-5.
11. Maia AL, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RM, Maciel LM, et al. Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: Brazilian consensus. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007; 51(5): 867-93.

12. McLeod DS, Watters KF, Carpenter AD, Ladenson PW, Cooper DS, Ding EL. Thyrotropin and thyroid cancer diagnosis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:2682-92.
13. Maia FF, Matos PS, Silva BP, Pallone AT, Pavin EJ, Vassallo J, et al. Role of ultrasound, clinical and scintigraphic parameters to predict malignancy in thyroid nodule. *Head Neck Oncol.* 2011; 3:17. doi: 10.1186/1758-3284-3-17.
14. Wienke JR, Chong WK, Fielding JR, Zou KH, Mittelstaedt CA. Sonographic features of benign thyroid nodules: interobserver reliability and overlap with malignancy. *J Ultrasound Med.* 2003;22:1027-31.
15. Horvath E, Majlis S, Rossi R, Franco C, Niedmann JP, Castro A, et al. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1748-51.
16. Park JY, Lee HJ, Jang HW, Kim HK, Yi JH, Lee W, et al. A proposal for a thyroid imaging reporting and data system for ultrasound features of thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2009;19(11):1257-64.
17. Kwak JY, Han KH, Yoon JH, Moon HJ, Son EJ, Park SH, et al. Thyroid imaging reporting and data system for US features of nodules: a step in establishing better stratification of cancer risk. *Radiology.* 2011;260(3):892-9.
18. Russ G, Bigorgne C, Royer B, Rouxel A, Bienvenu-Perrard M. Le système TIRADS en échographie thyroïdienne. *J Radiol.* 2011;92(7-8):701-13.
19. Russ G, Royer B, Bigorgne C, Rouxel A, Bienvenu-Perrard M, Leenhardt L. Prospective evaluation of thyroid imaging reporting and data system on 4550 nodules with and without elastography. *Eur J Endocrinol.* 2013;168 (5):649-55.
20. Kamran SC, Marqusee E, Kim MI, Frates MC, Ritner J, Peters H, et al. Thyroid nodule size and prediction of cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98:564-70.
21. Moses W, Weng J, Sansano I, Peng M, Khanafshar E, Ljung BM, et al. Molecular testing for somatic mutations improves the accuracy of thyroid fine-needle aspiration biopsy. *World J Surg.* 2010;34:2589-94.
22. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 292-306.
23. Matos PS, Ferreira AP, Facuri FO, Assumpção LVM, Metze K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology.* 2005;47:391–401.

24. Puglisi F, Cesselli D, Damante G, Pellizzari L, Beltrami CA, Di Loreto C. Expression of Pax-8, p53 and bcl-2 in human benign and malignant thyroid diseases. *Anticancer Res.* 2000; 20: 311-6.
25. Zhu X, Sun T, Lu H, Zhou X, Lu Y, Cai X, et al. Diagnostic significance of CK19, RET, galectin-3 and HBME-1 expression for papillary thyroid carcinoma. *J Clin Pathol.* 2010; 63:786-9.
26. Saiz AD, Olvera M, Rezk S, Florentine BA, McCourty A, Brynes RK. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol.* 2002; 198:157–62.
27. Carvalho JF, Blank M, Shoenfeld Y. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Autoimmune Diseases. *J Clin Immunol.* 2007; 27: 246-56.
28. Erickson LA, Yousef OM, Jin L, Lohse CM, Pankratz VS, Lloyd RV. p27kip1 expression distinguishes papillary hyperplasia in Graves' disease from papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol.* 2000;13:1014- 9.
29. Itoh A, Iwase K, Jimbo S, Yamamoto H, Yamamoto N, Kokubo M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and presence of angiovascular cells in tissues from different thyroid disorders. *World J Surg.* 2010; 34:242-8.
30. de Araujo-Filho VJ, Alves VA, de Castro IV, Lourenço SV, Cernea CR, Brandão LG, et al. Vascular endothelial growth factor expression in invasive papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2009; 19:1233-7.
31. Mar KC, Eimoto T, Nagaya S, Tateyama H. Cell proliferation marker MCM2, but not Ki67, is helpful for distinguishing between minimally invasive follicular carcinoma and follicular adenoma of the thyroid. *Histopathology.* 2006; 48:801–7.
32. Siironen P, Nordling S, Louhimo J, Haapiainen R, Haglund C. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Ki-67, and p21 in patients with papillary thyroid cancer. *Tumour Biol.* 2005; 26:50-6.
33. Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV. Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol.* 1998;11:169-74.
34. Khoo ML, Freeman JL, Witterick IJ, Irish JC, Rotstein LE, Gullane PJ, et al. Underexpression of p27/Kip in thyroid papillary microcarcinomas with gross metastatic disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128:253-7.

35. Karlidag T, Cobanoglu B, Keles E, Alpay HC, Ozercan I, Kaygusuz I, et al. Expression of Bax, p53, and p27/kip in patients with papillary thyroid carcinoma with or without cervical nodal metastasis. *Am J Otolaryngol*. 2007;28(1):31-6.
36. Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Berean K, et al. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. *Am J Pathol*. 1995;146:1309-19.
37. Maeta Y, Tsujitani S, Matsumoto S. Expression of Mcl-1 and p53 proteins predicts the survival of patients with T3 gastric carcinoma. *Gastric Cancer*. 2004;7:78–84.
38. Zhang T, Zhao C, Luo L, Zhao H, Cheng J, Xu F. The expression of Mcl-1 in human cervical cancer and its clinical significance. *Med Oncol*. 2012;29:1985–91.
39. Akgul C. Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66:1326–36.
40. Kakudo K, Wakasa T, Ohta Y, Yane K, Ito Y, Yamashita H. Prognostic classification of thyroid follicular cell tumors using Ki-67 labeling index: Risk stratification of thyroid follicular cell carcinomas. *Endocrine J*. 2015; 62:1-12.
41. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 3516-20.
42. Yang L, Perez AA, Fujie S, Warden C, Li J, Wang Y, et al. Wnt modulates MCL1 to control cell survival in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2014;14:124.
43. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS letters*. 2010; 584: 2981-9.
44. Davies L, Welch HG. Thyroid cancer survival in the United States - Observational data from 1973–2005. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010; 136: 440-4.
45. Kim SW, In Lee J, Kim JW, Ki CS, Oh YL, Choi YL, et al. BRAFV600E Mutation Analysis in Fine-Needle Aspiration Cytology Specimens for Evaluation of Thyroid Nodule: A Large Series in a BRAFV600E-Prevalent Population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:3693-700.
46. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, et al. Molecular Testing for Mutations in Improving the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Thyroid Nodules. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:2092–98.

47. Rodolico V, Cabibi D, Pizzolanti G, et al. BRAF V600E mutation and p27 kip1 expression in papillary carcinomas of the thyroid ≤ 1 cm and their paired lymph node metastases. *Cancer*. 2007;110:1218-26.
48. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33:42-50.
49. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 2003;63:1454-57.
50. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:3947-52.
51. Finley DJ, Zhu B, Barden CB, Fahey TJ 3rd. Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling. *Ann Surg*. 2004; 240: 425-36.
52. Maciel RMB, Kimura ET, Cerutti JM. Patogênese dos tumores diferenciados da tireóide (Papilífero e Follicular). *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005;49:691-700.
53. Tanimoto C, Hirakawa S, Kawasaki H, Hayakawa N, Ota Z. Apoptosis in thyroid disease: a histochemical study. *Endocr J*. 1995; 42:193-201.
54. Acibucu F, Dökmetaş HS, Tutar Y, Elagoz S, Kilicli F. Correlations between the expression levels of micro-RNA146b, 221, 222 and p27Kip1 protein mRNA and the clinicopathologic parameters in papillary thyroid cancers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122:137-43.
55. Abulkheir IL, Mohammad DB. Value of immunohistochemical expression of p27 and galectin-3 in differentiation between follicular adenoma and follicular carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012; 20:131-40.
56. Viacava P, Bocci G, Tonacchera M, Fanelli G, DeServi M, Agretti P, et al. Markers of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis in thyroid adenomas: a

comparative immunohistochemical and genetic investigation of functioning and nonfunctioning nodules. *Thyroid*. 2007;17:191-7.

57. Pisani T, Pantellini F, Centanni M, Vecchione A, Giovagnoli MR. Immunocytochemical expression of Ki67 and laminin in Hurthle cell adenomas and carcinomas. *Anticancer Res*. 2003;23(4):3323-6.

58. Müller-Höcker J. Immunoreactivity of p53, Ki-67, and Bcl 2 in oncocytic adenomas and carcinomas of the thyroid gland. *Hum Pathol*. 1999;30:926-33.

59. Tallini G, Garcia-Rostan G, Herrero A, Zeltermann D, Viale G, Bosari S, et al. Downregulation of p27KIP1 and Ki67/Mib1 labeling index support the classification of thyroid carcinoma into prognostically relevant categories. *Am J Surg Pathol*. 1999;23:678-85.

60. Mazeto GM, Oliveira ML, Padovani CR, Montenegro MR, Aragon FF, Schmitt FC. Thyroid cell proliferation in Graves' disease. Use of MIB-1 monoclonal antibody. *Acta Cytol*. 2004;48:57-63.

61. Ahn J, Hong SA, Lee SE, Kim J, Oh YS, Park SJ, et al. Cytoplasmic localization of Jab1 and p27 Kip1 might be associated with invasiveness of papillary thyroid carcinoma. *Endocr J*. 2009;56:707-13.

62. Troncone G, Laccarino A, Russo M, Palmieri EA, Volante M, Papotti M, et al. Accumulation of p27(kip1) is associated with cyclin D3 overexpression in the oxyphilic (Hurthle cell) variant of follicular thyroid carcinoma. *J Clin Pathol*. 2007;60:377-381.

63. Chen S, Fazle Akbar SM, Luo Y, Deng L, Huang H, et al. Analysis of the Expression of Fas, FasL and Bcl-2 in the Pathogenesis of Autoimmune Thyroid Disorders. *Cell Mol Immunol*. 2004;1:224-28.

64. Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, et al. Fas/Fas Ligand Up-Regulation and BCL-2 Down-Regulation May Be Significant in the Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(6):2199-203.

65. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*. 2005;17(3):393-403.
66. David MS, Letai A. Targeting the B-Cell Lymphoma/Leukemia 2 Family in Cancer. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 3127-35.
67. Panka DJ, Cho DC, Atkins MB, Mier JW. GSK-3beta inhibition enhances sorafenib-induced apoptosis in melanoma cell lines. *J Biol Chem*. 2008;283: 726-32.
68. Mojsa B, Lassot I, Desagher S. Mcl-1 Ubiquitination: Unique Regulator of an Essential Survival Protein. *Cell*. 2014; 3:418-37.
69. Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*. 2005; 307:1101-4.
70. Bae J, Leo CP, Hsu SY, Hsueh AJ. MCL-1S, a Splicing Variant of the Antiapoptotic BCL-2 Family Member MCL-1, Encodes a Proapoptotic Protein Possessing Only the BH3 Domain. *J Biol Chem*. 2000; 275: 25255-61.
71. Abdulghani J, Allen JE, Dicker DT, Liu YY, Goldenberg D, Smith CD, et al. Sorafenib sensitizes solid tumors to Apo2L/TRAIL and Apo2L/TRAIL receptor agonist antibodies by the Jak2-Stat3-Mcl1 axis. *PLoS One*. 2013; 26: 8:e75414.
72. Herrant M, Jacquél A, Marchetti S, Belhacène N, Colosetti P, Luciano F et al. Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene*. 2004; 23:7863–73.
73. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007;26:6133-40.
74. Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, Tropé CG, Kristensen GB. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18: 3775-81.
75. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995; 270(5239):1189–92.
76. Borgerson KL, Bretz JD, Baker Jr JR. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity*. 1999; 30:251–264.


77. Erdogan M, Karadeniz M, Berdeli A, Tamsel S, Ertan Y, Uluer H, et al. Fas/Fas ligand gene polymorphism in patients with papillary thyroid cancer in the Turkish population. *J. Endocrinol Invest.* 2007;30:411-6.
78. Mitsiades N, Poulaki V, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Stamenkovic I. Thyroid carcinoma cells are resistant to FAS-mediated apoptosis but sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res.* 2000; 60: 4122-9.
79. Mitsiades CS, Poulaki V, Mitsiades N. The role of apoptosis-inducing receptors of the tumor necrosis factor family in thyroid cancer. *J Endocrinol.* 2003; 178: 205-16.
80. Bayraktaroglu T, Boztepe H, Kapran Y, Tanakol R, Alagöl F. Fas ligand (FasL, Apo-1L/CD95L) expression and clinical outcome in papillary microcarcinoma and papillary thyroid carcinomas with diameter smaller than 1.5 centimeters. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010;118: 537-43.
81. Ahmad M, Shi Y. TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells: potential for therapeutic intervention. *Oncogene.* 2000;19:3363-71.
82. Cvejic D, Selemetjev S, Savin S, Paunovic I, Petrovic I, Tatic S. Apoptosis and proliferation related molecules (Bcl-2, Bax, p53, PCNA) in papillary microcarcinoma versus papillary carcinoma of the thyroid. *Pathology.* 2008; 40(5):475-80.
83. Mezosi E, Yamazaki H, Bretz JD, Wang SH, Arscott PL, Utsugi S, et al. Aberrant apoptosis in thyroid epithelial cells from goiter nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(9):4264-72.
84. El May MV, Zekri S, Boubaker S, Ladgham A, El May A. Chronic iodine overload and apoptosis in cold nodules from endemic multinodular goiters. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 2005;82: 69-74.
85. Tuner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JAH. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocrine Reviews.* 2008; 24: 600-32.
86. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285:1182–86.
87. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2000; 55:15–36.
88. Semenza G. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med.* 2003; 54:17–28.
89. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer.* 2000;7:165–97.

90. Sato K. Vascular endothelial growth factors and thyroid disorders. *Endocrine J.* 2001; 48(6):635–46.
91. Garcia EA, Simões K, Wakamatsu A, Ressio RA, Alves VA, Longatto-Filho A, et al. Lymphatic vessel density and VEGF-C expression are significantly different among benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol.* 2010; 21: 101-7.
92. Wang Y, Hua Q. Clinical significance of HIF-1 α , VEGF and VEGF-C expression in papillary thyroid carcinoma. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2007; 21: 204-6.
93. Hsiao PJ, Lu MY, Chiang FY, Shin SJ, Tai YD, Juo SH. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in thyroid cancer. *J Endocrinol.* 2007;195(2):265-70.
94. Huang SM, Lee JC, Wu TJ, Chow NH. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor for thyroid neoplasms. *World J Surg.* 2001; 25:302-6.
95. Jebreel A, England J, Bedford K, Murphy J, Karsai L, Atkin S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. *Int J Exp Pathol.* 2007;88(4):271-7.
96. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and down regulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene.* 1995; 11:1569.
97. Soh EY, Eigelberger MS, Kim KJ, Wong MG, Young DM, Clark OH, et al. Neutralizing vascular endothelial growth factor activity inhibits thyroid cancer growth in vivo. *Surgery.* 2000; 128:1059–65.
98. Boelaert K, Horacek J, Holder RL, Watkinson JC, Sheppard MC, Franklyn JA. Serum Thyrotropin Concentration as a Novel Predictor of Malignancy in Thyroid Nodules Investigated by Fine-Needle Aspiration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:4295–301.
99. Gerschpacher M, Göbl C, Anderwald C, Gessl A, Krebs M. Thyrotropin serum concentrations in patients with papillary thyroid microcancers. *Thyroid.* 2010; 20:389-92.
100. Anil C, Goksel S, Gursoy A. Hashimoto's Thyroiditis Is Not Associated with Increased Risk of Thyroid Cancer in Patients with Thyroid Nodules: A Single-Center Prospective Study. *Thyroid.* 2010; 20:1-6.

101. Moon HJ, Kim EK, Kwak JY. Malignancy risk stratification in thyroid nodules with benign results on cytology: combination of thyroid imaging reporting and data system and Bethesda system. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21:1898-903.
102. Gweon HM, Son EJ, Youk JH, Kim JA. Thyroid nodules with Bethesda system III cytology: can ultrasonography guide the next step? *Ann Surg Oncol*. 2013;20(9):3083-8.
103. Ho AS, Sarti EE, Jain KS, Wang H, Nixon IJ, Shaha AR, et al. Malignancy rate in thyroid nodules classified as Bethesda Category III (AUS/FLUS). *Thyroid*. 2014;24(5):832-9.
104. Branet F, Brousset P, Krajewski S, et al. Expression of the cell death-inducing gene bax in carcinomas developed from the follicular cells of the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 2726-30.
105. <http://www.abcam.com/MCL1-antibody-Y37-ab32087.html>
106. Ulrich-Pur H, Erovic BM, Soleiman A, Jech B, Pennwieser W, Czembirek C, et al. Changes in Mcl-1 expression in rectal cancer in relation to neo-adjuvant radiotherapy. *Wien Klin Wochenschr*. 2005; 117:136-40.
107. Shigemasa K, Katoh O, Shiroyama Y, Mihara S, Mukai K, Nagai N, et al. Increased MCL-1 expression is associated with poor prognosis in ovarian carcinomas. *Jpn J Cancer Res*. 2002;93(5):542-50.
108. Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell*. 2006; 21: 749-60.
109. Miyauchi A, Kudo T, Hirokawa M, Ito Y, Kihara M, Higashiyama T, et al. Ki-67 labeling index is a predictor of postoperative persistente disease and câncer growth and a prognostic indicator in Papillary Thyroid Carcinoma. *Eur Thyroid J* 2013;2:67-64.
110. Xu W, Li X, Chen S, Huang J, Lin S, Lin J, et al. Expression and distribution of S-100, CD83 and apoptosis-related proteins (Fas, FasL and Bcl-2) in tissues of thyroid carcinoma. *Eur J Histochem*. 2008; 52:153-62.

ANEXOS

Aprovação do Comitê de Ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☎ www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 21/10/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 844/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0671.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "MECANISMOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR, APOPTOSE E ANGIOGÊNESE EM NÓDULO DE TIREÓIDE: CORRELAÇÃO CLÍNICA, ULTRASSONOGRÁFICA, CINTILOGRÁFICA E CITO-PATOLÓGICA".
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Frederico Fernandes Ribeiro Maia
INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/10/2008
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 21/10/09 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar, por análise imunohistoquímica, elementos envolvidos nos mecanismos de proliferação celular, apoptose e angiogênese e sua correlação com dados clínicos (funcional), cintilográficos, ultrassonográficos e cito - patológicos de nódulo benigno de tireóide (isolado/BMN) em pacientes submetidos à tireoidectomia.

III - SUMÁRIO

Trata-se de uma pesquisa de análise experimental, controlada, em corte transversal, de pacientes portadores de nódulo único de tireóide ou BMN, atendidos no Ambulatório de Nódulo de Tireóide do HC - Unicamp, entre 1998 e 2008, submetidos a tireoidectomia total e parcial. Será procedido estudo IHQ do nódulo tireoidiano e tecido tireoidiano normal adjacente para análise da expressão dos seguintes marcadores: Faz, fas-ligante, Bid, Bcl2 e Mcl-1; Ki-67 e MIB -1; proteína p27Kip1 e fator de crescimento vascular endotelial. A expressão de fatores anti e pró-apoptóticos será avaliada em relação à evolução e crescimento do nódulo, função tireoideana, uso de droga anti-tireoidiana. Será realizada análise comparativa dos dados cintilográficos, ultrassonográficos e cito-patológicos dos nódulos tiroideanos quanto ao padrão de expressão dos marcadores de apoptose e angiogênese. Serão estudadas 80 tireóides de indivíduos adultos de ambos os sexos, acompanhados no ambulatório de Nódulo de Tireóide, disciplina de Endocrinologia, HC-Unicamp, com diagnóstico de nódulo de tireóide único, múltiplo, atóxico ou tóxico. O grupo controle será constituído de 10 espécimes de tireóide normal oriundas de tireoidectomias realizadas durante o procedimento cirurgico rotineiro para neoplasia de laringe.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto bem elaborado, exequível, respeitando os aspectos éticos envolvidos no tipo de estudo, com dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apropriado ao estudo.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de outubro de 2008.

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Artigo 1: Publicado - aceite em 04/06/14

Artigo 2: submetido.

ORIGINAL ARTICLE

Thyroid imaging reporting and data system score combined with Bethesda system for malignancy risk stratification in thyroid nodules with indeterminate results on cytology

Frederico F. R. Maia*, Patrícia S. Matost, Elizabeth J. Pavin* and Denise E. Zantut-Wittmann*

*Endocrinology Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, and †Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Summary

Context The thyroid imaging reporting and data system (TI-RADS) was designed to better select patients who had undergone fine-needle aspiration biopsies (FNABs) with high sensitivity and accuracy. However, the combination of TI-RADS scores and Bethesda system categories in indeterminate thyroid nodules has not been examined extensively.

Objective This study aimed to stratify indeterminate thyroid nodules (Bethesda categories III, IV and V) according to risk of malignancy as determined by combining TI-RADS score with Bethesda system classification.

Design Retrospective study. Histopathological, cytological and ultrasound (US) data were available for 242 cases after surgery, including 136 indeterminate nodules.

Methods All thyroid cytopathological slides and US reports were reviewed and classified according to Bethesda system and TI-RADS categories. The malignancy rate was determined for each Bethesda category, TI-RADS score and both methods combined of indeterminate nodules.

Results The malignancy rates were 8.7%, 51.3% and 67.5% for Bethesda categories III, IV and V, respectively. Based on histopathological comparison, the accuracy was 66.7% for TI-RADS greyscale. TI-RADS 3 and 4A scores were observed in 80% of Bethesda III cases, which led to 80% sensitivity and 90% of negative predictive value (NPV). In contrast, for nodules scored as TI-RADS 4B and 5, the combined cytological results of Bethesda IV and V resulted in a higher risk of malignancy (75% and 76.9%, respectively, $P < 0.001$).

Conclusions In view of the high NPV of TI-RADS 3/4A only in Bethesda III category, a surgical approach could be considered for lesions defined as Bethesda III, IV and V when TI-RADS 4B and 5 were concomitant.

(Received 20 March 2014; returned for revision 23 April 2014; finally revised 2 June 2014; accepted 4 June 2014)

Introduction

Although fine-needle aspiration biopsy (FNAB) is considered the gold standard for evaluating thyroid nodules, cytology is indeterminate in approximately 10–30% of cases.¹ After the results from Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology,² the indeterminate cytology is classified into atypia of undetermined significance (Bethesda category III), follicular neoplasm or suspicious for follicular neoplasm (Bethesda IV) and suspicious for malignancy (Bethesda V). As the majority of patients with thyroid nodules can be managed conservatively, efforts to better select candidates for thyroid surgery are justified.^{1,3}

The thyroid imaging reporting and data system (TI-RADS) was designed to improve the selection of patients who had undergone FNABs due to malignancy risk.^{4–8} A combination of TI-RADS and Bethesda system and its impact on medical approach in thyroid nodular disease have not been examined extensively. Moon *et al.*⁹ suggested repeating FNAB for nodules benign at first cytology scored as TI-RADS 4c and 5 due to the risk of malignancy in this group, similar to previous reports considering suspicious sonographic parameters for malignancy.^{10,11} However, data about the role of ultrasound (US) suspicious features of malignancy scored as TI-RADS and Bethesda system to predict malignancy for indeterminate thyroid nodules are still limited.

From 2009 to 2013, four separate teams^{4–8} suggested an interesting TI-RADS score derived from the breast imaging reporting and data system (BI-RADS) defined by the American College of Radiology.^{12,13} The TI-RADS terminology was first used by Horvath *et al.*⁴ based on ten combined US features of thyroid nodules related to malignancy. Furthermore, the first TI-RADS systems^{4,5} were considered difficult to apply in the clinical field due to their complexity of combined US features. Previous data demonstrated the impact of thyroid US to predict malignancy in indeterminate thyroid nodules^{1,3,14–19}; none of them enrolled

Correspondence: Denise E. Zantut-Wittmann, Endocrinology Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária 13083-887, Campinas, SP, Brazil. Tel./Fax: +55-19-3521775; E-mail: zantutw@fcm.unicamp.br

TI-RADS score concomitant with Bethesda system. Thus, in 2011, Korean and French groups proposed two novel TI-RADS interpretations.⁶⁻⁸ Russ *et al.*⁸ studied a prospective series of 263 operated thyroid nodules resulting in a high sensitivity (93.2%) and accuracy (62%) of the TI-RADS score for malignancy. Kwak *et al.*⁶ retrospectively studied 298 surgically treated thyroid nodules. They scored TI-RADS as 4a (one suspicious feature), 4b (two suspicious features), 4c (three or four suspicious features) and 5 (five suspicious features) using the malignancy risk of the BI-RADS criteria. In accordance with results obtained by Russ *et al.*,⁸ a practical flow chart was designed based on TI-RADS scores, which helps to stratify thyroid nodules recommended for US-guided FNABs (US-FNAB) and the risk of malignancy.

On the other hand, one of the limitations of this most recent version of TI-RADS⁸ was related to some significant US signs not considered for the flow chart, such as the halo sign, size and central flow by Doppler study. Furthermore, the high sensitivity (95.7%) and negative predictive value (NPV 99.7%) of TI-RADS method were based on cytopathological results, excluding the indeterminate samples (Bethesda III, IV and V), which certainly interfered with the final results. The knowledge about the impact of TI-RADS scores on different thyroid neoplasms, such as Bethesda III, IV and V, is still limited.

This study aimed to stratify indeterminate thyroid nodules (Bethesda categories III, IV and V) according to the risk of malignancy as determined by combining TI-RADS score with Bethesda system classification.

Methods and subjects

Design and study population

The institutional review board approved the study. The authors declare that there is no potential conflict of interest to disclose. We retrospectively studied data from 643 consecutive patients submitted to thyroid surgery between 2000 and 2012 in the University of Campinas Teaching Hospital, an iodine-replete area in Brazil. This study finally comprised 242 thyroid nodules after surgery, resulting in 136 indeterminate nodules (Bethesda III, IV

and V, Table 1) in which the sonographic, histopathological and cytological variables were available for statistical analysis. All patients who were preoperatively diagnosed with a thyroid nodule by US or clinical examination and who underwent US-FNAB were assessed retrospectively for the ability of clinical, US and laboratory variables to predict malignancy (Table 2).

Imaging technique and TI-RADS scoring

US scanning of the 242 thyroid glands and neck regions was performed using a 7–20 MHz bandwidth linear-array transducer. The real-time US was performed by the radiology team of our institution with experience in thyroid imaging. All nodules were retrospectively scored for TI-RADS as per the flow chart shown in Fig. 1 adapted from Russ *et al.*⁸ with the addition of the vascularity criteria described by Horvath *et al.*⁴ Nodules showing at least one suspicious characteristic (hypoechoogenicity, irregular margins, microcalcifications, taller-than-wide shape) were considered suspicious for malignancy and indicated the US-FNAB.^{1,2,6} The reviewed images and sonographic suspicious features for malignancy were scored as TI-RADS by the same author, blinded to histopathological results, based on the

Table 1. The Bethesda system category distribution and malignancy rate of indeterminate nodules according to cytological results of 242 surgically treated thyroid nodules in a single centre

Bethesda category	Benign (%)	Malignant (%)	Total (%)	Malignancy rate (%)
I	5 (3.8)	9 (8.1)	14 (5.8)	–
II	42 (32.1)	17 (15.3)	59 (24.4)	–
III	52 (39.7)	5 (4.5)	57 (23.5)	8.7
IV	19 (14.5)	20 (18.1)	39 (16.1)	51.3
V	13 (9.9)	27 (24.3)	40 (16.5)	67.5
VI	–	33 (29.7)	33 (13.7)*	–
Total	131 (54.1)	111 (45.9)	242 (100)	–

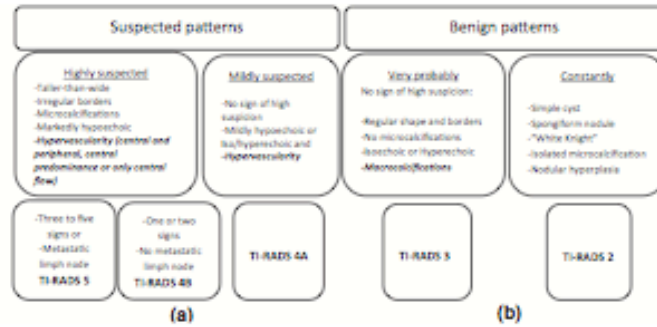
*Sensitivity 83.3%; accuracy 55.7%; negative predictive value 71.2%.

Table 2. Demographics and sonographic characteristics of 242 patients who underwent thyroid surgery in a single centre

Variables	Benign	Malignant	Total	P-value
Nodules (n)	131	111	242	–
Age (years) [median]	49	43	46.5	0.001
Female gender (n, %)	113/131 (86.3)	95/111 (85.5)	208/242 (85.9)	0.88
Nodule (number)	1.56 ± 1.05	1.78 ± 1.20	1.66 ± 1.12	0.14
Solitary nodule (n, %)	89/126 (70.6)	67/109 (61.5)	156/235 (66.4)	0.13
Nodule size (cm) [median]	2.5	1.8	2.1	0.002
Size >2 cm (n, %)	85/124 (68.5)	51/111 (45.9)	136/235 (57.8)	NS
TSH (mU/ml) [median]	1.86	1.10	1.1	1.15
Autoimmune thyroid disease (%)	26	27.9	26.9	0.77
Suspicious for malignancy by US (n, %)	79/117 (67.5)	85/103 (82.5)	164/220 (74.5)	0.001
TI-RADS 4B and 5 (n, %)	23/117 (19.6)	52/102 (50.9)	75/219 (34.2)	0.001

TI-RADS, thyroid imaging reporting and data system; TSH, thyroid stimulating hormone; US, ultrasound; NS, not significant.

Fig. 1 Flow chart adapted from Russ et al.⁸ was designed to score thyroid nodules by ultrasound categorized into thyroid imaging reporting and data system (TI-RADS) score with the addition of the vascularity criteria by Doppler analysis. (a) Suspicious features for malignancy. (b) Benign ultrasound patterns.



adapted flow chart (Fig. 1). If a nodule showed no suspicious features, it was classified as benign (TI-RADS 2); TI-RADS 3 represents a highly probable benign; TI-RADS 4A (low suspicious: one feature) and 4B (two suspicious features) and TI-RADS 5 corresponds to higher malignant risk (three or more criteria; Fig. 1). The nodule size and presence of other nodules within the thyroid were also noted. The most suspicious nodule was included in the study.

Based on the previous literature,^{20–22} the flow pattern seen via power Doppler examination was ranked for each nodule on a scale of 1–5 as follows: absent, perinodular alone, mixed with perinodular prominence, mixed with intranodular prominence and exclusively intranodular, respectively. The categories 3–5 were grouped as the hypervascular nodules and defined suspicious criteria by Doppler.

Cytological and histopathological features

When an US suspicious thyroid nodule over 0.5 cm was detected,^{7,8} US-FNAB was performed using a 22-gauge needle without local anaesthesia. At least three slides were obtained for cytological analysis. The follow-up and surgery criteria were based on American Thyroid Association (ATA) guidelines.¹ All slides containing FNAB results were analysed by an expert cytopathologist of our team using the six-tiered diagnostic Bethesda system.² The cytological and histopathological review was blinded to outcome data. The cytological result was classified into six categories: unsatisfactory (I), benign (II), follicular lesion of undetermined significance (AUS/FLUS) (III), follicular cell neoplasm or suspicious for follicular cell neoplasm (IV), suspicious for malignancy (V) and malignant (VI), according to previous data.² An unsatisfactory sample was defined as the absence of at least six follicular cell groups, each one containing 10–15 cells derived from at least two aspirates of a nodule.^{1,2} Results for malignancy were confirmed by surgery as follows: 97 papillary thyroid carcinomas (66 classical; 31 follicular variants), 11 follicular carcinomas and three medullary carcinomas. There were 131 benign cases: 41 adenomas and 90 adenomatous goitres. Two independent, blinded observers reviewed all thyroid specimen slides to confirm the histological diagnosis as per World Health Organization (WHO) histological classification and Livolsi's classification of thyroid pathology.^{23–25}

Statistical analysis

Histological results were used as the standard reference. The malignancy rate was determined for each Bethesda category, for TI-RADS score and for a combination of both methods for indeterminate thyroid nodules (Bethesda III, IV and V). Sensitivity, specificity, NPV, positive predictive value (PPV) and accuracy were also calculated based on histological results. TI-RADS scores 4B and 5 (highly suspicious) were considered positive, while scores 3 and 4A (probably benign and low suspicious, respectively) were considered negative. Data were analysed by chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables and Mann-Whitney *U*-test for the quantitative variables of benign and malignant nodules ($P < 0.05$).

Results

The histopathological findings in the 242 surgically resected thyroid nodules identified 111 malignant and 131 benign cases. Surgery was indicated based on cytological results (Table 1) or when the nodule was benign but causing compressive or clinical symptoms (59 cases). The clinical and laboratory data evaluated did not find any statistical difference between malignant and benign nodules, especially in relation to thyrotropin levels, thyroid autoimmunity, size over 2 cm and gender (Table 2). Solitary nodules represented 66.4% of cases. Benign nodules were significantly larger than malignant cases (median 2.5 vs 1.8 cm, respectively; $P = 0.002$) at final histology.

Comparison of TI-RADS score and cytopathological results – Bethesda system

The total number of carcinomas was 111, a rate of 46.3% of the sample. The malignancy rate for indeterminate cytological results is detailed in Table 1. When compared with Bethesda categories II and VI, the TI-RADS score showed high sensitivity (89%), specificity of 50%, NPV of 80% and accuracy of 51%. Of 57 Bethesda system III nodules, 34 (59.6%) underwent surgery without repeat FNAB in contrast to 23 (40.4%) cases clinically followed up. In those Bethesda system III nodules that were followed without immediate surgical resection, US-FNAB was performed a median of 3.75 times, with surgical indication defined

Table 3. Malignancy rate according to TI-RADS* scores of 219 thyroid nodules surgically resected in a single centre

TI-RADS categories	No. of cases (n)	Malignancy rate (n, %)	Benign (n, %)	Malignant (n, %)
3	57	29.8	40 (34.1)	17 (16.6)
4A	87	37.9	54 (46.1)	33 (32.3)
4B	48	64.5	17 (14.6)	31 (30.4)
5	27	77.7	6 (5.2)	21 (20.7)
Total	219	46.5	117	102

*TI-RADS, thyroid imaging reporting and data system. $P < 0.001$.

after the third FNAB in 58.8% of cases (average follow-up of 21.2 months). After the multivariate analysis, the significant US malignant features were hypoechogenicity ($P = 0.002$), irregular margins ($P = 0.003$), microcalcifications ($P = 0.025$), taller-than-wide shape and hypervascularity ($P < 0.01$). Thyroid nodules were scored as TI-RADS 3, 4A, 4B and 5 with their malignancy rate, as follows (Table 3). The score TI-RADS 5 was a strong predictor of malignancy in spite of cytological result ($P < 0.001$). Nodular hypervascularity was detected in 39.8% of cases. The majority of malignant cases showed mixed and predominant central flow (57.8%) in contrast to 24.2% of benign nodules ($P = 0.01$). A shift to intranodular vascularization had a significant correlation with malignancy ($P < 0.001$).

Combined TI-RADS score, Bethesda system and histopathological results

When compared with histopathological results, the accuracy of TI-RADS score was 66.7%. The TI-RADS scores 4B and 5 were strongly correlated to malignancy detected in 50.9% (52/102) of malignant vs 19.6% (23/117) of benign nodules ($P < 0.001$), resulting in high specificity (80.3%), PPV (70%) and accuracy (66.7%). The nodules scored as TI-RADS 5 (27 cases) showed high specificity (95%) and PPV (78%) for thyroid malignancy based on histopathological comparison. The malignancy rate of indeterminate thyroid nodules based on the combined TI-RADS score and Bethesda cytological result is detailed in Table 4.

The thyroid nodules classified as Bethesda III were scored as TI-RADS 3/4A in 80% of cases, resulting in 80% sensitivity and 90% NPV (Table 4). In contrast, for the highly suspicious thyroid nodules by US (TI-RADS 4B and 5), the combined Bethesda IV or V cytological results showed the highest risk of malignancy (75% and 76.9%, respectively), which represented a significant increase in malignancy rate for indeterminate nodules classified as Bethesda IV and V combined with TI-RADS scores 4B/5 vs the cytological result alone (Tables 1 and 4).

Discussion

The TI-RADS classification is considered as a powerful tool used to select high-risk nodules for US-FNAB.⁴⁻⁸ However, the role of combining TI-RADS score with the Bethesda system to further stratify thyroid cancer risk for cytologically indeterminate thyroid nodules is unclear. This study demonstrated the high sensitivity and NPV of Bethesda III nodules with a TI-RADS score of 3/4A, which may suggest a conservative approach (follow-up and repeat US-FNAB) is appropriate. In contrast, TI-RADS scores 4B and 5 in combination with Bethesda III, IV and V may suggest that proceeding directly to surgery is appropriate, with repeat FNAB unnecessary due to the high malignancy rates observed.

Cervical ultrasound is the method of choice for the study of thyroid nodules, and it allows for the evaluation of size, location and the suggestive features of malignancy. Due to the popularized use of US and the ease of access to the cytology through US-FNABs, there is a need to recognize specific criteria to better select nodules for US-FNAB to decrease costs and maximize benefits.^{1,2} The TI-RADS score was designed as a powerful tool for this purpose to avoid unnecessary FNABs and better select candidates for the surgical treatment.⁴⁻⁸ The first two studies based on TI-RADS^{4,5} were considered complex and difficult to manage in daily practice. Horvath *et al.*⁴ studied prospective cases using power Doppler analysis and determined the high sensitivity (88%) and NPV (88%) of TI-RADS criteria. They considered the iso- or hyperechoic nodules with central flow (isolated, predominant or concomitant to peripheral flow) as hypervascular nodules, categorized as TI-RADS 4A. Our results

Table 4. Thyroid cancer risk rate by the combined TI-RADS* score and Bethesda system in 127 indeterminate thyroid nodules surgically resected in a single centre

TI-RADS* score	Total (n)	Bethesda III		Bethesda IV		Bethesda V	
		N	Malignancy rate (%)	N	Malignancy rate (%)	N	Malignancy rate (%)
3	37	21	2 (9.5)	8	3 (37.5)	8	5 (62.5)
4A	50	23	2 (8.7)	11	4 (36.4)	16	11 (68.9)
4B	26	10	1 (10)	10	7 (70)	6	4 (66.7)
5	14	1	–	6	5 (83.3)	7	6 (85.7)
Total	127	55	5 (9.1)	35	19 (54.2)	37	26 (70.2)

*TI-RADS, thyroid imaging reporting and data system. $P < 0.001$.

were similar to the Korean⁶ and French^{7,8} data in relation to the suspicious US features for malignancy, such as hypoechogenicity, microcalcifications, shape and irregular margins.

According to the previous TI-RADS definition of risk groups,⁴⁻⁸ patients with TI-RADS 2 (benign findings) and TI-RADS 3 (probably benign) do not require FNAB. However, Russ *et al.*⁸ prospectively obtained a malignancy rate of 25.7% and 44.1% for operated thyroid nodules scored as TI-RADS 3 and 4A, respectively. The TI-RADS score compared with histopathological results showed 62% of accuracy in this series.⁵ These data were similar to ours (Table 3), resulting in 89% of sensitivity and 66.7% of accuracy. On the other hand, the Kwak *et al.*'s⁶ TI-RADS score was similar to BI-RADS⁹ and based on both fitted probability and risk of malignancy. However, they did not consider the nodule vascularity as practical guidelines recommended.^{1,2} Increased nodular vascularity is considered a highly suspicious feature on US-FNAB as per the ATA guidelines.¹ Several studies have previously demonstrated the utility of Doppler ultrasound in assessing thyroid nodules suspicious for malignancy.^{20-22,26}

The proposed follow-up of most patients with an initial Bethesda III result is repeat FNAB.² The main benefit of repeating FNAB after an initial indeterminate cytology is sparing patients with a benign FNAB result obtained during the follow-up from unnecessary surgery. Gweon *et al.*¹⁸ found 55.5% malignancy rate in 155 operated Bethesda III thyroid nodules in a single centre. This study showed that 59.3% (51/86) of them acquired benign cytology after repeat FNAB. In a similar trend, a recent report analysed 541 operated thyroid nodules classified as Bethesda III. Of the 96 (17.7%) nodules submitted to repeat FNAB, 41 (42.7%) cases resulted in benign cytology. The malignancy rate was confirmed based on surgical pathology in 26.6% of nodules treated after second Bethesda III diagnosis.²⁷ Thus, we believe that the combined TI-RADS score with Bethesda system could be used as a simple tool to better stratify thyroid cancer risk and may help clinicians to guide the surgical decision. In view of the high sensitivity and NPV of TI-RADS 3/4A demonstrated for nodules resulting Bethesda III cytology, a conservative approach based on follow-up and repeat FNAB, including molecular markers,^{3,28} may be discussed in these cases. In our series, the surgical indication for Bethesda III nodules occurred after the second re-biopsy in almost 60% of these cases in about 1-2 years (median interval of 21 months). Conversely, a surgical approach could be considered for lesions defined as Bethesda III, IV and V, especially when TI-RADS scores of 4B and 5 were concomitant due to the increased malignancy rate observed in comparison with Bethesda results alone. However, the data need to be tested by prospective multicentre and nonspecialized members to confirm their clinical application.

This study has some limitations. Firstly, some sonographic signs were not considered in the flow chart, such as halo sign, unencapsulated nodules and elastography, to simplify the method of analysis. Secondly, the thyroid US study was performed by the different radiologists of our hospital, and the absence of a specific protocol could interfere with the final result; however, we only considered the nodules with all data

based on TI-RADS criteria to minimize this problem. Thirdly, this study was based on a single specialized thyroid unit experience, so the data need to be tested by prospective multicentre and nonspecialized members. Fourthly, the cytological results from nodules with TI-RADS score 2 were not compared with US data, which may interfere with TI-RADS results; we did not intend to confirm all nodules classified as TI-RADS scores 2 and 3 surgically as this would not have been ethically acceptable. Fifthly, the accuracy of TI-RADS score was based on histopathological comparison with TI-RADS scores 3 and 4A, which were classified as negative, due to the majority of these cases being benign at final histology, in contrast to TI-RADS scores 4B and 5 that were considered positive (malignancy rate over 75%). Part of this bias is compensated for by the size of the subjects included in this series.

In conclusion, after an initial fine-needle aspiration biopsy result categorized as Bethesda III, IV or V, the thyroid imaging reporting and data system assessment may help the clinician decide between repeat fine-needle aspiration biopsy and surgery. Due to the high sensitivity and negative predictive value of thyroid imaging reporting and data system score 3/4A demonstrated for nodules resulting in Bethesda III cytology, a conservative approach may be discussed in these cases. Conversely, a surgical decision could be considered for indeterminate lesions (Bethesda III, IV and V), especially when thyroid imaging reporting and data system scores 4B and 5 were concomitant. The thyroid imaging reporting and data system score combined with Bethesda system could be used as a simple tool to better stratify thyroid cancer risk in indeterminate thyroid nodules.

Acknowledgements

This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (Fapesp), SP-Brazil, under grant no. 2008/10183-7, and the National Council for Scientific and Technological Development (Capes), Ministry of Education, Brazil (Maia, FFR: PhD), under grant no. 33003017065.

Disclosure statement

No competing financial interests exist that could be perceived as being harmful to the impartiality of the research reported.

Authors' contributions

Frederico F.R. Maia conducted the sonographic review and participated in the conception, database collection, statistical analysis, interpretation and review of the literature. Patrícia S. Matos conducted the cyto- and histopathological review and interpretation. Elizabeth J. Pavin conceived of the study and participated in its design. Denise E. Zantut-Wittmann conceived of the study and participated in its design, the review of the literature, the interpretation of the results and the coordination. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

References

- 1 Cooper, D.S., Doherty, G.M., Haugen, B.R. et al. (2009) Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, **19**, 1167–1214.
- 2 Theoharis, C.G., Schofield, K.M., Hammers, L. et al. (2009) The Bethesda thyroid fine-needle aspiration classification system: year 1 at an academic institution. *Thyroid*, **19**, 1215–1223.
- 3 Maia, F.F.R. & Zantut-Wittmann, D.E. (2012) Thyroid nodule management: clinical, ultrasound and cytopathological parameters for predicting malignancy. *Clinics*, **67**, 945–954.
- 4 Horvath, E., Majlis, S., Rossi, R. et al. (2009) An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 1748–1751.
- 5 Park, J.Y., Lee, H.J., Jang, H.W. et al. (2009) A proposal for a thyroid imaging reporting and data system for ultrasound features of thyroid carcinoma. *Thyroid*, **19**, 1257–1264.
- 6 Kwak, J.Y., Han, K.H., Yoon, J.H. et al. (2011) Thyroid imaging reporting and data system for US features of nodules: a step in establishing better stratification of cancer risk. *Radiology*, **260**, 892–899.
- 7 Russ, G., Bigorgne, C., Royer, B. et al. (2011) Le système TIR-ADS en échographie thyroïdienne. *Journal de Radiologie*, **92**, 701–713.
- 8 Russ, G., Royer, B., Bigorgne, C. et al. (2013) Prospective evaluation of thyroid imaging reporting and data system on 4550 nodules with and without elastography. *European Journal of Endocrinology*, **168**, 649–655.
- 9 Moon, H.J., Kim, E.K. & Kwak, J.Y. (2014) Malignancy risk stratification in thyroid nodules with Benign results on cytology: combination of thyroid imaging reporting and data system and Bethesda system. *Annals of Surgical Oncology*, **21**, 1898–1903.
- 10 Maia, F.F.R., Matos, P.S., Pavin, E.J. et al. (2011) Value of repeat ultrasound-guided fine-needle aspiration in thyroid nodule with a first benign cytologic result: impact of ultrasound to predict malignancy. *Endocrine*, **40**, 290–296.
- 11 Kwak, J.Y., Koo, H., Youk, J.H. et al. (2010) Value of US correlation of a thyroid nodule with initially benign cytologic results. *Radiology*, **254**, 292–300.
- 12 American College of Radiology, BI-RADS Committee. (2003) ACR BI-RADS® ultrasound. In: ACR BI-RADS Breast Imaging and Reporting Data System: Breast Imaging Atlas, 4th edn. American College of Radiology, BI-RADS Committee, Reston, VA, 1–86.
- 13 Stavros, A.T., Thickman, D., Rapp, C.L. et al. (1995) Solid breast nodules: use of sonography to distinguish between benign and malignant lesions. *Radiology*, **196**, 123–134.
- 14 Gul, K., Ersoy, R., Dirikoc, A. et al. (2009) Ultrasonographic evaluation of thyroid nodules: comparison of ultrasonographic, cytological, and histopathological findings. *Endocrine*, **36**, 464–472.
- 15 Maia, F.F.R., Matos, P.S., Pavin, E.J. et al. (2011) Value of ultrasound and cytological classification system to predict the malignancy of thyroid nodules with indeterminate cytology. *Endocrine Pathology*, **22**, 66–73.
- 16 Gharib, H., Papini, E. & Paschke, R. (2008) Thyroid nodules: a review of current guidelines, practices, and prospects. *European Journal of Endocrinology*, **159**, 493–505.
- 17 Lee, M.J., Hong, S.W., Chung, W.Y. et al. (2011) Cytological results of ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology for thyroid nodules: emphasis on correlation with sonographic findings. *Yonsei Medical Journal*, **52**, 838–844.
- 18 Gweon, H.M., Son, E.J., Youk, J.H. et al. (2013) Thyroid nodules with Bethesda system III cytology: can ultrasonography guide the next step? *Annals of Surgical Oncology*, **20**, 3083–3088.
- 19 Li, Q.S., Chen, S.H., Xiong, H.H. et al. (2010) Papillary thyroid carcinoma on sonography. *Clinical Imaging*, **34**, 121–126.
- 20 Chammas, M.C., Gerhard, R., de Oliveira, L.R. et al. (2005) Thyroid nodules: evaluation with power Doppler and duplex Doppler ultrasound. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, **132**, 874–882.
- 21 Bakhshaei, M., Davoudi, Y., Mehrabi, M. et al. (2008) Vascular pattern and spectral parameters of power Doppler ultrasound as predictors of malignancy risk in thyroid nodules. *Laryngoscope*, **118**, 2182–2186.
- 22 Tamsel, S., Demirpolat, G., Erdogan, M. et al. (2007) Power Doppler US patterns of vascularity and spectral Doppler US parameters in predicting malignancy in thyroid nodules. *Clinical Radiology*, **62**, 245–251.
- 23 Rosai, J., Carcangiu, M.L. & DeLellis, R.A. (1992) Atlas of tumor pathology. In: Tumors of the Thyroid Gland, 3rd series, fasc. 5. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 21–48.
- 24 LiVolsi, V.A. & Baloch, Z.W. (2004) Follicular neoplasms of the thyroid: view, biases, and experiences. *Advances in Anatomic Pathology*, **11**, 279–287.
- 25 Wittekind, C., Compton, C.C., Greene, F.L. et al. (2002) TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*, **94**, 2511–2516.
- 26 De Nicola, H., Szejnfeld, J., Logullo, A.F. et al. (2005) Flow pattern and vascular resistive index as predictors of malignancy risk in thyroid follicular neoplasms. *Journal of Ultrasound in Medicine*, **24**, 897–904.
- 27 Ho, A.S., Sarti, E.E., Jain, K.S. et al. (2014) Malignancy rate in thyroid nodules classified as Bethesda Category III (AUS/FLUS). *Thyroid*, **24**, 832–839.
- 28 Alexander, E.K., Kennedy, G.C., Baloch, Z.W. et al. (2012) Pre-operative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *New England Journal of Medicine*, **367**, 705–715.

Expression of Mcl-1 and Ki-67 in Papillary Thyroid Carcinomas

Frederico F. R. Maia¹, José Vassallo^{2,3}, Glauce A. Pinto⁴, Elizabeth J. Pavin¹, Patrícia S. Matos² & Denise E. Zantut-Wittmann¹

¹Endocrinology Division, Department of Internal Medicine, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

²Department of Pathology, Medical Science School, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

³Laboratory of Investigative and Molecular Pathology, CIPED, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

⁴Laboratory of Specialized Pathology, CAISM, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Authors' full contact information:

Denise E. Zantut-Wittmann, PhD

Endocrinology Division, Department of Internal Medicine - University of Campinas

Rua Tessalia Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária 13083-887, Campinas, SP, Brazil.

Tel./Fax: +55-19-3521775; email contact: zantutw@fcm.unicamp.br

Short running title: Mcl-1 and Ki-67 expression in PTC.

Word count: 2872

ARTICLE CATEGORY: Original research article

ABSTRACT

Studying molecules that are differentially expressed in cancers as well as benign and normal tissues is crucial for identifying novel biomarkers for cancer immunotherapy. This study aimed to investigate the clinical utility of the immunochemical expression of the proliferative cell marker Ki-67 and the apoptotic blocker Mcl-1 in papillary thyroid carcinoma (PTC).

Methods: We built a tissue microarray with 282 thyroid specimens consisting of the following: 59 PTCs; 79 benign thyroid diseases (22 follicular adenomas; 57 adenomatoid hyperplasia); 33 Hashimoto's thyroiditis (HT) specimens; and 111 normal thyroid tissues. Clinical history and ultrasound data were retrospectively obtained by chart review.

Results: Mcl-1 overexpression was evident in 66.7% of the PTC tissues compared to 32% of the benign thyroid diseases. Mcl-1 strong staining distinguished benign from malignant thyroid lesions (sensitivity = 61.3%; specificity = 72.8%; negative predictive value, NPV = 68%; positive predictive value, PPV = 66.7% and 67.5% accuracy). Positive nuclear Ki-67 staining was observed in 34% of PTCs versus 19% of thyroid adenomas ($P=0.031$). Strong Mcl-1 and Ki-67 co-expression was identified in 57.5% of PTCs with a higher PPV (75.8%). Mcl-1 and Ki-67 expression was not associated with any clinicopathological feature of malignancy.

Conclusions: Mcl-1 overexpression may help distinguish PTC from benign thyroid diseases. Our data demonstrated that Mcl-1 and Ki-67 might be promising biomarkers for differentiated thyroid cancer.

Keywords: Mcl-1; Ki-67; Papillary thyroid cancer; Thyroid nodule; Apoptosis.

INTRODUCTION

There are limitations to the cytological diagnosis of thyroid nodules, especially follicular lesions. Differential diagnosis between the follicular-patterned thyroid lesions is often difficult to determine, even for the most experienced pathologists [1-3]. A precise pathological diagnosis is critical for effective clinical management in these cases and guides complete thyroidectomy and neck exploration after a diagnosis of malignancy based on thyroid lobectomies. Most papillary thyroid carcinoma (PTC) cases show low rates of recurrence and good prognosis based on long term follow up [4,5]. However, some cases have a poor prognosis including patients over 45 years old with BRAF-positive mutations; furthermore, these patients might become insensitive to radioiodine therapy [2,5-7]. Studying molecules that are differentially expressed between cancers as well as benign and normal tissues is crucial for identifying novel biomarkers for cancer immunotherapy. Thus, methods that could accurately distinguish benign thyroid lesions from differentiated thyroid carcinomas (DTC) are greatly desired.

The carcinogenesis process is related to an accumulation of neoplastic cells due to increased cell production or decreased cell death [8]. Ki-67 is a cell proliferation protein that is recognized as a neoplastic marker that is studied in different tissues and is related to poor prognosis based on DTC follow up [9-16]. According to Miyauchi et al. [9], a Ki-67 labeling index of more than 10%, which is considered to be strong expression in PTC cases, is associated with persistent biochemical disease (positive thyroglobulin) representing a poor prognosis criterion. Some authors believe that Ki-67 may help distinguish thyroid follicular adenomas (TFAs) from PTC [9,10,12-14]; however, the follicular carcinoma results are still controversial [10,11,15]. Tallini et al. found a poor prognosis related to Ki-67 overexpression in 90 DTC patients, particularly in cases of papillary or follicular carcinomas with unfavorable pathologic features [14].

On the other hand, in the carcinogenesis process, many molecular markers are involved in apoptosis control, such as Bcl-2 (B-cell lymphoma), Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1), Fas/FasL, p53, and p21 [17-20]. Mcl-1 is an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family that has been implicated in tumor cell death and cell survival and confers chemotherapeutic resistance [20,21]. In 1996, Branet et al. [22] studied Mcl-1 immunochemical (IHQ) staining in 23 PTC specimens compared to 12 TFA tissue samples. They concluded that Bcl-2 family genes contribute to the pathogenesis of thyroid carcinomas. Over the last two decades, there have been limited data related to Mcl-1 protein expression in different thyroid tissues and the impact of the expression levels on the clinical prognosis in PTC [18,22]. However, Mcl-1 expression has been shown to be a poor

prognostic marker in other solid tumors, such as breast, cervical, colon, ovarian, and gastric cancers [20,23-26]. Moreover, there is evidence of the involvement of Mcl-1 protein and its association with Ki-67 expression resulting in poor prognosis, as demonstrated in cervical cancer [23].

Previous reports revealed the potential benefits of combined malignancy markers such as cytokeratin 19 (CK-19), galectin-3 (Gal-3), HBME-1 (Hector Battifora Mesothelial cell), FoxP3 (Forkhead box P3), KAP-1 and mucin-1 (MUC-1) protein for routine thyroid pathology, which enhances the accuracy of the malignancy diagnosis [27-31]. However, further analysis is still required to evaluate the potential clinical use of these markers. The role of the apoptotic blocker, Mcl-1 protein, in the pathogenesis of thyroid carcinomas, TFAs, adenomatoid hyperplasia and HT is not well established in the present literature.

This study aimed to investigate the immunochemical expression of Ki-67 and Mcl-1 in routine histological evaluation in a large cohort of benign and malign thyroid lesions. Clinical history and sonographic information were also obtained by chart review, and these were correlated to the expression these markers.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The institutional review board approved the study, and no competing financial interests exist. We investigated 140 patients who underwent thyroidectomy between 2000 and 2013 whose specimens were maintained in the tissue bank of the General Hospital of the University of Campinas, which is an iodine sufficient area in Brazil. This study included 282 thyroid samples: 59 PTC specimens; 2 medullary thyroid carcinomas (MTC) were excluded at final analysis; 79 benign thyroid diseases (22 TFA; 57 adenomatoid hyperplasia tissues), 111 normal thyroid (107 adjacent peri-tumoral tissues plus 4 control cases) and 33 HT samples. The malignant specimens were classified as follows: 35 classic (CPTC), 3 tall cells (TCPTC), and 21 follicular PTC variants (FVPTC). Clinical history, laboratory, cytological and sonographic information was obtained by chart review. The clinical diagnosis of HT was confirmed based on high levels of serum antithyroperoxidase and antithyroglobulin antibodies.

Tissue Specimens

We selected 10% formalin-fixed, paraffin-embedded blocks that are routinely prepared from the surgical specimens of 142 thyroidectomies. Histologically normal thyroid tissue samples adjacent to tumors obtained

from thyroid surgery were used as controls. We used tissue arrays containing 282 thyroid samples as previous described. Two independent, blinded observers reviewed all of the thyroid slides to confirm the histopathological diagnosis based on the World Health Organization (WHO) histological classification and Livolsi's classification of thyroid pathology [32,33]. All malignant tumors were classified based on the American Joint Committee on Cancer classification system of pTNM parameters and age [34]. Surgery was indicated based on cytological results or when nodules were benign but caused compressive symptoms (16.8%).

Immunohistochemistry

Surgical specimens were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Tissue sections, 0.5 mm thick, were deparaffinized in xylene and dehydrated in a graded ethanol series. Endogenous peroxidase activity and nonspecific binding were blocked with 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 15 minutes. After rinsing in phosphate-buffered saline at a pH of 7.2, 10% bovine serum (Wako, Osaka, Japan) was applied for 20 minutes to block nonspecific reactions. Sections were then incubated with primary antibody overnight at 4°C. Two samples each of the nodular and peritumoral tissues, 1 mm in size, were selected for the tissue microarray. The sections were then incubated with the primary high specificity antibodies as follows: monoclonal Mcl-1 antibody (Rabbit, Ab-32087; Abcam, Cambridge, USA; diluted 1:50) and Ki-67 monoclonal antibody (clone MIB-1, M724001-2, Dako, CA, USA; diluted 1:500). A second-generation peroxidase-based, biotin-free polymer detection system (Advance, Dako) was used to visualize the antigen-antibody reaction. Positive and negative control tissues were included to ensure the specificity and reliability of the stains as follows: lymph nodes for Ki-67 and tonsils for Mcl-1, based on the manufacturer's recommendations. The monoclonal anti-Mcl-1 antibody does not cross-react with other Bcl-2 family members, which enhances the high specificity. The anti-Mcl-1 antibody detects a long chain Mcl-1 protein (37 kDa) called isoform 1, which is recognized as an anti-apoptotic protein [35,36]. Negative controls were obtained by replacing the primary antibody with non-immune serum, as previously described [20,22,25].

Immunohistochemical Evaluation

All analyses were performed on a light microscope (Eclipse E200, Nikon Instruments Inc., NY, USA). Two independent observers who were blinded to the histological results scored all of the slides, and cases with inconsistent scores were reevaluated to achieve a consensus score. Mcl-1-positive staining was defined as brown

staining in the cytoplasm of thyroid cells; the immunostaining of the follicular colloid in the absence of staining of the follicular epithelium or cytoplasm was considered nonspecific and negative. For Ki-67, the homogeneously stained nuclei indicated a positive result. The immunostaining of the follicular colloid in the absence of staining of the follicular epithelium or cytoplasm was considered to be nonspecific and negative. Visual IHC and a semiquantitative approach were used with different cut-offs for each marker, depending on the extent of expression, by calculating the percentage of immunoreactive cells on a minimum of 500 cells [20,25]. Evaluation included the proportion of reactive cells within tumors as well as the staining intensity. Sections were scanned at low power to identify areas that were evenly labeled, and an estimate of positive results with the Mcl-1 antibody was scored as follows: 0%, negative (grade 0); 1-19%, 1+ (grade 1); and over 20%, 2+ (grade 2). The IHQ overexpression results defined the anti-apoptotic Mcl-1 status as previously reported [20,25]. The intensity of the Ki-67 nuclei staining was scored on a four point scale: 0%, no staining; <1% (weak staining); 1-2% (clear staining); and >2% (robust positive staining). Clear and robust expression (>1%) was considered strong positivity [10,15].

Statistical Analysis

Histologic results were used as the standard reference. Sensitivity, specificity, negative and positive predictive values (NPV; PPV, respectively) and accuracy were also calculated based on histological results, with Mcl-1 protein overexpression as positive and weak or undetected Mcl-1 protein expression as negative. A multivariate logistic regression model was applied to correlate Mcl-1 expression with the Ki-67 immunochemical marker and the clinical and US data. The results were analyzed by chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables and Mann-Whitney test for the quantitative variables of benign and malign nodules. All of the tests were performed using Statistical Analysis System (SAS) for Windows, version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), at a 0.05 significance level.

RESULTS

The histological findings in the 138 thyroidectomies (4 control cases excluded) identified 59 (42.8%) malignant cases and 79 (57.2%) benign thyroid diseases. The clinical and laboratory data did not reveal any significant differences between the malignant and benign nodules, especially related to gender, TSH levels, thyroid autoimmunity markers, cold nodule, and size over 2 cm. Two or more suspicious US parameters (hypoechoogenicity, irregular margins, microcalcifications, taller than wide, capsule invasion, central flow predominance) were

strongly correlated with malignancy ($P < 0.001$). Indeterminate cytological results were found in 55.8% of cases (77/138: 43 classified as Bethesda III; 14, as Bethesda IV; 20, as Bethesda V).

Immunohistochemical Analyses

The immunostaining results of apoptotic and proliferative cell markers in neoplastic and noncancerous thyroid lesions are summarized in Table 1. The final tumor stages for all 59 PTCs according to TNM classification showed 86.4% of tumors in stage I or II and 13.6% in stage III or IV. The predominant TNM result was T1-2, N0, M0.

The expression profile of Mcl-1 in human thyroid cancer, benign thyroid disease and normal tissue

Mcl-1 overexpression was evident in 66.7% of the PTC specimens compared to 32% of benign thyroid diseases (Fig. 1, $P=0.003$). Mcl-1 strong staining distinguished benign from malign thyroid lesions with 67.5% accuracy (sensitivity = 61.3%; specificity = 72.8%; negative predictive value, NPV = 68%; positive predictive value, PPV = 66.7%). Strong Mcl-1 expression in the different thyroid tissue subsets is summarized in Table 1. In addition, to distinguish benign from malignant thyroid tissues, Mcl-1 expression discriminated both FVPTC and CPTC from adenomatoid hyperplasia ($P < 0.001$), TFA ($P < 0.05$) and HT tissues ($P < 0.01$). Benign thyroid diseases showed a similar profile of Mcl-1 overexpression with no significant difference between TFA and adenomatoid hyperplasia specimens (Table 1) or HT and normal thyroid tissues. There was no significant difference in Mcl-1 status between CPTC and FVPTC.

Mcl-1 and Ki-67 expression in PTC, benign thyroid disease specimens and normal tissue

The strong Mcl-1 expression and its associations with Ki-67 staining are summarized in Figure 2. Ki-67 showed a significantly higher proliferative rate in malignant tissues represented by PTC (34%), followed by TFA (19%), adenomatoid hyperplasia (7.1%) and normal thyroid tissues ($P=0.031$), with high specificity (85.7%) and moderate-to-high PPV (65.2%) and accuracy (57.8%). Strong Mcl-1 and Ki-67 co-expression was identified in 57.5% of the PTCs cases versus 29.1% of the benign thyroid diseases ($P < 0.001$), enhancing the PPV (Fig. 2).

Correlation of Mcl-1 and Ki-67 expression with clinical, laboratory and sonographic data

No significant correlations were found between Mcl-1 expression and clinicopathological features of malignancy (Table 2). Ki-67 expression was correlated with the presence of anti-thyroid antibodies in PTCs ($P=0.03$).

DISCUSSION

In this study, we observed frequent Mcl-1-positive staining in surgically resected PTCs in contrast to benign thyroid diseases and normal thyroid tissues. A positive correlation between Mcl-1 and Ki-67 expression was observed in the malignant specimens (PTC). The anti-apoptotic status of Mcl-1 expression was based on IHQ analysis, consistent with previous reports [20,22,25]. Techniques such as mRNA analysis or western blot (WB) were not available in this study; nevertheless, previous reports showed higher correlations between these methods and IHQ results [23,36]. Furthermore, the anti-Mcl-1 antibody detected the long chain Mcl-1 (isoform 1) protein, holding an anti-apoptotic function, consistent with WB results [35,36], supporting our data interpretation and conclusions. None of the previous reports discriminated the Mcl-1 isoforms, and all of them defined the Mcl-1 overexpression as an anti-apoptotic status [20,22-26].

Apoptosis is the main physiological process of cell death and is precisely regulated. The loss of control of any active pathway that leads to cell death apoptosis mechanisms may result in an imbalance between proliferation and apoptosis, which most likely enhances the tumorigenesis process [8,37,38]. Some studies demonstrated the impact of combining malignancy markers to increase the reliability and differential diagnosis of PTCs and benign thyroid diseases [11-14, 28-30]. The association between the Mcl-1, a cell death blocker, and Ki-67, a proliferation cell marker, was not previously described in thyroid reports. In the last two decades, there have been limited data in relation to the Mcl-1 immunochemical profile in thyroid neoplasms. Branet et al. [22] found Mcl-1 overexpression (polyclonal antibody, diluted 1:800) in 65.2% (15/23) of PTC specimens in comparison to 58.3% (7/12) of TFA cases. The small sample (35 cases) and technical differences with the Mcl-1 antibodies (dilution and positivity criteria) most likely led to the divergent results compared to the present data. We verified that almost one-third of benign thyroid diseases exhibited robust Mcl-1 positivity, with no difference between TFA, adenomatoid hyperplasia and HT specimens. Mcl-1 overexpression may help distinguish between benign thyroid diseases and malign tumors (PTC), with an accuracy of almost 70%.

There is insufficient data about the relationship between Mcl-1 expression in thyroid glands and clinical outcomes in PTC [18,21,37]. Zhang et al. [23] obtained a high correlation between Mcl-1 and Ki-67 expression in resected cervical cancers. Their results showed the worst cumulative survival in the patients who presented with the phenotype Mcl-1(+)/Ki-67(+) associated with advanced histological grade, tumor size and lymph node involvement. Maeta et al. [20] demonstrated the relationship between Mcl-1 staining and poor outcomes in

almost 70% of resected gastric cancer specimens. Our data showed no correlation between clinicopathological and sonographic parameters and Mcl-1 expression in PTC cases. We verified the frequent occurrence of Mcl-1 expression in PTCs and their close relationship to Ki-67 expression. However, our results should not be extrapolated to follicular thyroid carcinomas and should not be used to identify individuals with poor prognosis, especially in high-risk PTC cases, at this time. Furthermore, our study sought to demonstrate the clinical utility of Mcl-1 expression in PTC specimens compared to benign thyroid diseases for enhancing the histological diagnosis.

Mcl-1 is regulated at the transcriptional, post-transcriptional and translational levels [21,37,38]. Further studies are needed to clarify the relationship between Mcl-1 expression and clinical prognosis in advanced thyroid tumors and its implications for the therapeutic use of tyrosine-kinase inhibitors. Sorafenib is a multikinase inhibitor that was reported to suppress a number of kinases and still acts as a Mcl-1 antagonist [39,40]. Sorafenib inhibits the pro-survival function of Mcl-1 most likely due to MAPK (mitogen-activated protein kinase) and inactivation of the suppressor tumoral gene Fbw7 [39]. Furthermore, Sorafenib inhibits the Jak2/Stat3/Mcl-1 axis, contributing to the apoptotic response and cell death based on human anaplastic thyroid carcinoma samples [40]. The exact mechanism remains unclear, and a large series is needed to define the clinical application of Mcl-1 expression in malignant thyroid tumors.

Our results showed a higher proliferative rate for Ki-67 in PTC specimens (34%) consistent with the Saiz et al. [10] results in 19 PTCs and 10 TFA cases. Erickson et al. verified that Ki-67 expression could also distinguish TFAs (n=16) from thyroid follicular carcinomas (n=23), with a significantly higher expression of Ki-67 in patients with metastases [13]. In relation to thyroid cancer, our study demonstrated that Ki-67 positivity associated with Mcl-1 expression increased the PPV for histologically diagnosed thyroid malignancy. Kakudo et al. [16] proposed a risk stratification of thyroid follicular cell tumors based on the Ki-67 labeling index, considering high-grade histological features, such as tumor necrosis, increased mitoses, and nuclear pleomorphism, together with a high Ki-67 labeling index over 10%, as predictors of high-risk DTC and suggested a possible risk for anaplastic transformation.

The immunoreactive and cytoplasmic or nuclear apoptotic and proliferative cell markers may be helpful in the differential histological diagnosis between malignant and benign thyroid samples [27-30]. Here, we found an almost 70% accuracy, sensitivity and specificity for Mcl-1 expression for distinguishing benign and malignant thyroid tumors. Similarly, Martins et al. [29] found a 69% sensitivity and 75% specificity for KAP-1 expression in the differential diagnosis of benign and malign lesions; Cunha et al. [31] found 61.8% accuracy, 62.1%

sensitivity and 61.4% specificity for FoxP3 staining, whereas Morari et al. [30] found 89% sensitivity and 53% specificity for MUC-1 protein expression in the histological differentiation between benign and malignant thyroid tissues. Based on these results, we suggest that Mcl-1 protein expression may help differentiate benign thyroid diseases and PTC and could be a valid tool for routine pathological evaluation.

In summary, this study showed that Mcl-1 and Ki-67 protein expression levels are important markers of thyroid malignancy. The present data suggest that Mcl-1 status may help histologically diagnose PTC and characterize follicular-patterned thyroid lesions. Large studies are needed to determine whether these results are associated with effects on the clinical prognosis and therapeutics in advanced thyroid cancer.

Author contributions

Frederico F. R. Maia conducted the ultrasound, cytopathological and immunochemical review and participated in the conception, database collection, statistical analysis, and interpretation and review of the literature. José Vassallo conducted and coordinated the immunochemical review, study design, and results interpretation. Glauce A. Pinto coordinated the immunochemical study and design. Elizabeth J. Pavin conceived of the study and participated in the design. Patrícia S. Matos conducted the cytopathological and histopathological review and interpretation. Denise E. Zantut-Wittmann conceived the study and participated in the design, interpretation of the results and coordination. All of the authors read and approved the final version of the manuscript.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- 1) *Kondo T, Ezzat S, Asa SL*. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 292-306
- 2) *Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR et al*. Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1167-1214
- 3) *Theoharis CG, Schofield KM, Hammers L et al*. The Bethesda thyroid fine-needle aspiration classification system: year 1 at an academic institution. *Thyroid* 2009; 19: 1215-1223
- 4) *Jonklaas J, Sarlis NJ, Litofsky D et al*. Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy. *Thyroid* 2006; 16: 1229-1242
- 5) *Molinaro E, Giani C, Agate L et al*. Patients with differentiated thyroid cancer who underwent radioiodine thyroid remnant ablation with low-activity ¹³¹I after either recombinant human TSH or thyroid hormone therapy withdrawal showed the same outcome after a 10-year follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 2693-2700
- 6) *Davies L, Welch HG*. Thyroid cancer survival in the United States - Observational data from 1973–2005. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 136: 440-444
- 7) *Xing M, Alzahrani AS, Carson KA et al*. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33: 42-50
- 8) *Tanimoto C, Hirakawa S, Kawasaki H et al*. Apoptosis in thyroid disease: a histochemical study. *Endocr J* 1995; 42: 193-201
- 9) *Miyauchi A, Kudo T, Hirokawa M et al*. Ki-67 labeling index is a predictor of postoperative persistent disease and cancer growth and a prognostic indicator in Papillary Thyroid Carcinoma. *Eur Thyroid J* 2013; 2: 57-64
- 10) *Saiz AD, Olvera M, Rezk S et al*. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 2002; 198: 157–162
- 11) *Mar KC, Eimoto T, Nagaya S et al*. Cell proliferation marker MCM2, but not Ki67, is helpful for distinguishing between minimally invasive follicular carcinoma and follicular adenoma of the thyroid. *Histopathology* 2006; 48: 801–807
- 12) *Siironen P, Nordling S, Louhimo J et al*. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Ki-67, and p21 in patients with papillary thyroid cancer. *Tumour Biol* 2005; 26: 50-56
- 13) *Erickson LA, Jin L, Wollan PC et al*. Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol* 1998; 11: 169-174

- 352 14) *Tallini G, Garcia-Rostan G, Herrero A et al.* Downregulation of p27KIP1 and Ki67/Mib1 labeling index
 353 support the classification of thyroid carcinoma into prognostically relevant categories. *Am J Surg Pathol* 1999;
 354 23: 678-685
- 355 15) *Viacava P, Bocci G, Tonacchera M et al.* Markers of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis in
 356 thyroid adenomas: a comparative immunohistochemical and genetic investigation of functioning and
 357 nonfunctioning nodules. *Thyroid* 2007; 17: 191-197
- 358 16) *Kakudo K, Wakasa T, Ohta Y et al.* Prognostic classification of thyroid follicular cell tumors using Ki-67
 359 labeling index: Risk stratification of thyroid follicular cell carcinomas. *Endocrine J* 2015; 62: 1-12
- 360 17) *Chen S, Fazle Akbar SM, Zhen Z et al.* Analysis of the Expression of Fas, FasL and Bcl-2 in the
 361 Pathogenesis of Autoimmune Thyroid Disorders. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 224-228
- 362 18) *Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M et al.* Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human
 363 tissues. *Am J Pathol* 1995; 146: 1309-1319
- 364 19) *Puglisi F, Cesselli D, Damante G et al.* Expression of Pax-8, p53 and bcl-2 in human benign and malignant
 365 thyroid diseases. *Anticancer Res* 2000; 20: 311-306
- 366 20) *Maeta Y, Tsujitani S, Matsumoto S.* Expression of Mcl-1 and p53 proteins predicts the survival of patients
 367 with T3 gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2004; 7: 78-84
- 368 21) *Akgul C.* Mcl-1 is a potential therapeutic target in multiple types of cancer. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66:
 369 1326-1336
- 370 22) *Branet F, Brousset P, Krajewski S et al.* Expression of the cell death-inducing gene bax in carcinomas
 371 developed from the follicular cells of the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2726-2730
- 372 23) *Zhang T, Zhao C, Luo L et al.* The expression of Mcl-1 in human cervical cancer and its clinical
 373 significance. *Med Oncol* 2012; 29: 1985-1991
- 374 24) *Yang L, Perez AA, Fujie S et al.* Wnt modulates MCL1 to control cell survival in triple negative breast
 375 cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 124
- 376 25) *Baekelandt M, Holm R, Nesland JM et al.* Expression of apoptosis-related proteins is an independent
 377 determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3775-3781
- 378 26) *Ulrich-Pur H, Erovcic BM, Soleiman A et al.* Changes in Mcl-1 expression in rectal cancer in relation to neo-
 379 adjuvant radiotherapy. *Wien Klin Wochenschr* 2005; 117: 136-140
- 380 27) *Zhu X, Sun T, Lu H et al.* Diagnostic significance of CK19, RET, galectin-3 and HBME-1 expression for
 381 papillary thyroid carcinoma. *J Clin Pathol* 2010; 63: 786-789

- 382 28) *Matos PS, Ferreira AP, Facuri FO et al.* Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3
 383 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology* 2005; 47: 391–401
- 384 29) *Martins MB, Marcello MA, Morari EC et al.* Clinical utility of KAP-1 expression in thyroid lesions. *Endocr*
 385 *Pathol* 2013; 24: 77-82
- 386 30) *Morari EC, Silva JR, Guilhen AC et al.* Muc-1 expression may help characterize thyroid nodules but does
 387 not predict patients' outcome. *Endocr Pathol* 2010; 21: 242-249
- 388 31) *Cunha LL, Morari EC, Nonogaki S et al.* Foxp3 expression is associated with aggressiveness in
 389 differentiated thyroid carcinomas. *Clinics (Sao Paulo)* 2012; 67: 483-488
- 390 32) *Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA.* Atlas of tumor pathology, 3rd series, fas 5. Washington, DC: Armed
 391 Forces Institute of Pathology. Tumors of the thyroid gland. 1992; 21–48
- 392 33) *LiVolsi VA, Baloch ZW.* Follicular neoplasms of the thyroid: view, biases, and experiences. *Adv Anat Pathol*
 393 2004; 11: 279-287
- 394 34) *Wittekind C, Compton CC, Greene FL et al.* TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 2002; 94:
 395 2511–2516
- 396 35) *Bae J, Leo CP, Hsu SY et al.* MCL-1S, a Splicing Variant of the Antiapoptotic BCL-2 Family Member
 397 MCL-1, Encodes a Proapoptotic Protein Possessing Only the BH3 Domain. *J Biol Chem* 2000; 275: 25255-
 398 25261
- 399 36) <http://www.abcam.com/MCL1-antibody-Y37-ab32087.html>
- 400 37) *Thomas LW, Lam C, Edwards SW.* Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS letters* 2010;
 401 584: 2981-2989
- 402 38) *Mojca B, Lassot I, Desagher S.* Mcl-1 Ubiquitination: Unique Regulator of an Essential Survival Protein.
 403 *Cell* 2014; 3: 418-437
- 404 39) *Panka DJ, Cho DC, Atkins MB et al.* GSK-3beta inhibition enhances sorafenib-induced apoptosis in
 405 melanoma cell lines. *J Biol Chem* 2008; 283: 726-732
- 406 40) *Abdulghani J, Allen JE, Dicker DT et al.* Sorafenib sensitizes solid tumors to Apo2L/TRAIL and
 407 Apo2L/TRAIL receptor agonist antibodies by the Jak2-Stat3-Mcl1 axis. *PLoS One* 2013; 26: 8:e75414
 408
 409
 410
 411
-

Figure Legends

Figure 1 – Expression of Ki-67 and Mcl-1 in malignant and benign thyroid tissues: robust expression of Ki-67 (a) and Mcl-1 (c) in papillary thyroid cancer *versus* faint expression of Ki-67 and Mcl-1 in benign thyroid diseases, respectively (b, thyroid follicular adenoma and d, normal thyroid tissue) (x200).

Figure 2 – Schematic representation of the study cohorts and test results of Mcl-1 strong expression Ki-67 staining in resected thyroid nodules. PTC indicates papillary thyroid cancer; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Table 1 - Comparative frequency of immunohistochemical Mcl-1 and Ki-67 overexpression's in malignant specimens, benign thyroid diseases, Hashimoto's thyroiditis and normal thyroid tissues in a single center

Apoptotic markers	Malign	Benign Thyroid Diseases		Peritumoral		Total	P-value
	PTC	TFA	Adenomatoid Hyperplasia	HT	NOR		
	(n) / (%)	(n) / (%)	(n) / (%)	(n) / (%)	(n) / (%)	(n) / (%)	
Mcl-1	38/57 (66.7%)	8/21 (36.3%)	16/54 (29.1%)	9/32 (28.1%)	29/109 (26.6%)	100/134 (74.6%)	0.003
Ki-67	15/59 (34%)	4/21 (19%)	4/56 (7.1%)	6/32 (18.8%)	11/110 (10%)	40/138 (28.9%)	0.031

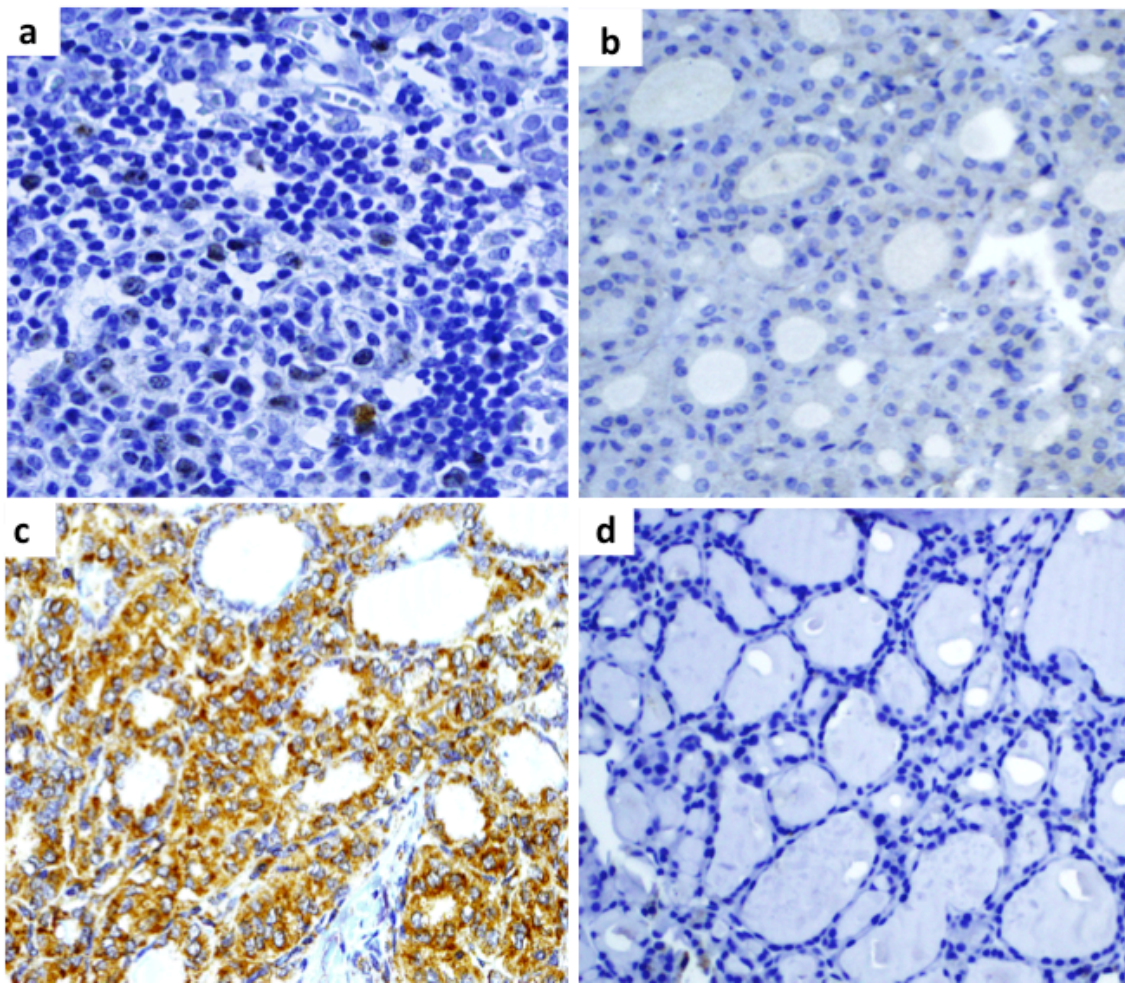
Notes: TFA: Thyroid follicular adenoma; HT: Hashimoto thyroiditis; Papillary thyroid carcinoma (PTC); NOR: normal thyroid tissues.

Table 2 – Correlation between the Mcl-1 overexpression and clinicopathological features

Variables	Mcl-1		Total	P-value
	POSITIVE	NEGATIVE		
	62	72	134	
Histologically malignancy diagnosis (n,%)*	40 (62.5%)	19 (26.3%)	59 (43.4%)	0.003
Age > 45 yrs.	35 (57.3%)	47 (65.2%)	82 (61.6%)	NS
Female gender (%)	55 (85.9%)	60 (83.3%)	115 (84.5%)	NS
Solitary Nodule (%)	38 (60.3%)	44 (62.9%)	82 (61.7%)	NS
Size > 2cm	32 (51.6%)	47 (70.1%)	79 (54.2%)	NS
TSH > 1.8 mU/ml	24 (50%)	20 (41.6%)	44 (45.8%)	NS
Suspicious ultrasound	46 (77.9%)	43 (65.2%)	89 (71.2%)	NS
TNM Stage III / IV	7/38 (18.4%)	2/19 (10.5%)	9/57 (15.8%)	NS

TSH: thyroid stimulating hormone. *Significant comparisons between the groups Mcl-1 positive vs. negative; the other comparisons displayed no statistical significance (NS); at $P < 0.05$.

483 **Figure 1**



498 **Figure 2**